

IMMUNITA' DELLA MUCOSA E VACCINAZIONE

(processi di immunizzazione attraverso la barriera della mucosa, sviluppi di nuovi metodi, autovaccino, revisione dei lavori)

Dr. Samorindo Peci PhD

Cerifos

Centro Ricerca e Formazione
Scientifica

Via Paisiello 24 20131 Milano



Abstract

Le mucose costituiscono l'ingresso principale per la maggior parte degli agenti patogeni microbici ma anche per antigeni innocui derivati dal cibo ingerito. Un sistema immunitario innato della mucosa vasto ed altamente specializzato protegge le superfici delle mucose ed il corpo interno da potenziali lesioni dall'ambiente. Il sistema immunitario della mucosa ha sviluppato una varietà di meccanismi immunitari in grado di discriminare invasori non patogeni e patogeni. È in grado di mantenere la tolleranza contro la pleora di antigeni ambientali e di indurre potenti immunità protettive al fine di evitare la colonizzazione della mucosa e l'invasione da parte dell'organismo patogeni microbici pericolosi. L'immunizzazione della mucosa con elementi anticorpali ed antigeni appropriati immunostimolanti possono indurre a prospettive di immunità contro agenti patogeni dannosi. In alternativa, può essere generata la tolleranza mucosa indotta contro auto antigeni o allergeni per mezzo della somministrazione per via mucosa di tali antigeni o anticorpi autologhi da soli o con immunomodulatori, potenziando le risposte regolatorie. Qui, sono state verificate le proprietà del sistema immunitario della mucosa e brevemente si è discusso riguardo i progressi nello sviluppo di vaccini della mucosa per la protezione contro le infezioni e per il trattamento di disturbi infiammatori, come le malattie autoimmuni o allergie di Tipo I.



IMMUNITÀ DELLA MUCOSA E VACCINAZIONE

Le mucose offrono una superficie di contatto di circa 400 m² con l'ambiente esterno, costituendo la porta d'ingresso principale per il cibo ma anche per gli agenti microbici. Esse sono caratterizzate da proprietà meccaniche, fisico-chimiche ed immunologiche che agiscono sinergicamente per evitare l'invasione da parte di corpi estranei. Il sistema immunitario associato alle mucose (SIAM) è un complesso altamente specializzato e ha proprietà caratteristiche che lo distinguono dal sistema immunitario generale. Queste proprietà uniche hanno la priorità nell'ambito dello sviluppo di vaccini, contro vari agenti patogeni microbici. Inoltre può indurre ad un fenomeno di annullamento sistemico denominato tolleranza orale dalla somministrazione di alcuni immunogeni per via mucosa. Questa caratteristica è stata sfruttata per sviluppare vaccini terapeutici contro alcune malattie autoimmuni e contro allergie di Tipo I.

Le mucose offrono una copertura del tratto aero-digestivo ed urogenitale, la congiuntiva, la parete dell'orecchio interno ed i canali di ghiandole esocrine. Le superfici delle mucose sono protette dalle aggressioni esterne da meccanismi di difesa fisico-chimiche e da un sistema immunitario innato delle mucose specifiche e specializzate.

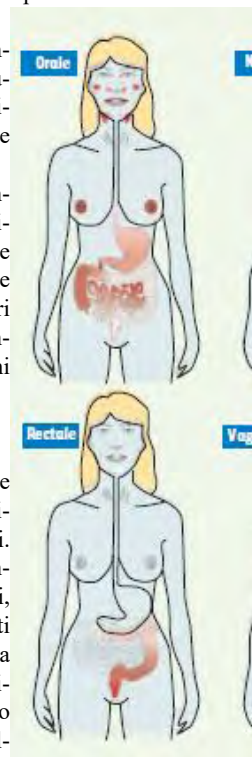
Il sistema immunitario associato alla mucosa (SIAM) (mucosa associated lymphoid tissue, MALT) comprende circa 80% delle cellule immunitarie dell'organismo e costituisce il più importante sistema linfoide dei mammiferi [1]. Esso ha tre grandi funzioni: (1) proteggere le superfici della mucosa contro la colonizzazione e l'invasione da agenti patogeni microbici; (2) impedire l'internalizzazione batteri commensali o antigeni non degradati come proteine derivate dal cibo e l'ambiente; e (3) impedire lo sviluppo di reazioni infiammatorie indesiderate contro alcuni antigeni che attraversano la barriera epiteliale.

Il tessuto linfoide associato alla mucosa

La SIAM ha dei siti induttori, dove i linfociti nativi vengono attivati dalle cellule presentanti antigene (CPAg), e dai siti effettori, dove le cellule effettrici (linfociti attivati e cellule dell'immunità innata) controllano localmente agenti estranei. Ad esempio, il tessuto linfoide associato al tratto digerente (gut-associated lymphoreticular tissue, GALT) comprende le placche di Peyer, gangli mesenterici, appendice o ancora tonsille, organi linfoidi organizzati che sono i principali siti di induzione delle risposte immunitarie intestinali [2]. I siti effettori della mucosa consistono nell'epitelio di rivestimento in cui si concentrano le cellule T intraepiteliali (LIE) e di anticorpi secretori, particolarmente secretori IgA (S-IgA). Il vano sotto-epiteliale, o la lamina propria, è un diffuso del sito in cui si accumulano cellule effettrici (cellule NK-like, i macrofagi, linfociti B et T). Le CPAg tra le cellule dendritiche (CD), sentinelle del sistema immunitario sono anche presenti nel tessuto linfoide della mucosa, pronto a catturare agenti estranei.

Meccanismi induttori

Gli antigeni presenti sulla superficie della mucosa possono essere catturati dalle cellule epiteliali o dalle cellule M presenti in alcuni tessuti delle mucose e specializzati nel campionamento di antigeni (Per la review, vedi [3]). In breve, gli antigeni in questo modo assorbiti, o i loro derivati sono trasmessi alle mucose CPAg (cellule B, i macrofagi, CD). Tra questi CPAg, i CD sono in grado di catturare direttamente anche gli antigeni alla luce della mucosa grazie all'estensione dei loro



dendriti tra cellule epiteliali. Quindi i CPAg migrano verso i siti induttori per attivare i linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ nativi. Alcuni antigeni possono anche essere presentati dalle cellule epiteliali a cellule T intraepiteliali vicini (cellule T3, cellule NKT). La natura degli antigeni, la loro concentrazione e la loro biodisponibilità, il tipo di CPAg coinvolti ed il microambiente sono parametri che influenzeranno una risposta immunitaria indotta. Così, la presentazione dell'antigene da parte delle mucose CD, la maggior parte delle molecole estranee non patogeno porta ad un fenomeno di immunosoppressione chiamato tolleranza orale. Questo tipo di risposta è principalmente spiegato dalla generazione dei linfociti T helper di tipo 2 (Th2) e dei linfociti T regolatori che producono IL-10 o TGF- β [4]. Al contrario, gli antigeni e le molecole immunostimolanti costituiscono la maggior parte degli agenti patogeni che sono portatori di modelli molecolari specifici o PAMP (pathogen-associated molecular patterns) che costituiscono segnali di pericolo. I PAMP sono riconosciuti dai recettori specifici o da sensori di pericolo (compreso il tipo di recettori Toll-like)

espressi dalle cellule epiteliali, da alcuni macrofagi o da CD. L'attivazione di questi diversi rivelatori di pericolo scatenano una cascata di segnalazioni che porta all'apertura di risposte immunitarie umorali e cellulare anti-infettive ed il controllo della tolleranza orale [2, 3]. I linfociti B e T attivati migrano all'interno della circolazione sanguigna attraverso la via linfatica efferente e si disperdono in modo selettivo nei tessuti effettori della mucosa per poi differenziarsi nelle cellule effettrici (plasmacellule secernenti anticorpi, le cellule citotossiche, cellule regolatorie). Un contingente dei linfociti attivati nei siti induttori si converte in cellula di memoria che circola tra i differenti siti induttori.

La migrazione delle cellule effettrici alla mucosa si ha in risposta a fattori chemiotattici (chemiochine) e/o dei prodotti infiammatori dal microambiente della mucosa. La loro domiciliazione della mucosa è orchestrata da meccanismi molecolari di riconoscimento limitato alle mucose coinvolgendo integrine e addressins specifiche [5]. I CD dei siti induttori della mucosa sembrano giocare un ruolo importante nella migrazione selettiva dei linfociti delle mucose. Pertanto, le murine CD isolate dai gangli mesenterici e dalle placche di Peyer aumentano l'espressione di integrina $\alpha 4\beta 7$ e del recettore CCR9 per chemiochina CCR9 sulla superficie di linfociti T che attivano, una firma molecolare di un futuro intestinale [6, 7]. L'acido retinoico prodotto da alcune popolazioni di CD intestinale sembra essere coinvolto in questo effetto [8]. Di recente, è stato dimostrato anche come CD intestinali esprimono l'integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103) fossero responsabili per la differenziazione delle cellule T CD4 e CD8 nelle cellule effettrici nel diventare mucosa [9, 10]. Tutti questi dati spiegano in parte il concetto di compartimentazione della SIAM, suggerito dall'osservazione di una redistribuzione preferenziale dei linfociti attivati a livello di una mucosa in originale o in una mucosa remota, piuttosto che un di organo sistemico.

Ciò implica che, in un approccio vaccinale, il percorso verso immunizzazione è selezionata in funzione del sito dove deve essere espressa la risposta effettrice. Come mostrato nella Figura 1, mentre l'immunizzazione per via orale può indurre notevoli risposte anticorpali nell'intestino grande, nel colon ascendente e nelle ghiandole salivari e mammarie, questo

percorso è inefficace per la produzione di anticorpi del tipo IgA a livello di segmento distale del colon, delle tonsille e della mucosa genitale femminile [13, 14]. L'immunizzazione nasale induce risposte preferibilmente anticorpi nel tratto mucose del tratto respiratorio e delle secrezioni respiratorie regionali (nasale e salivari) [14, 15]. Inoltre, l'immunizzazione per via nasale può indurre risposte anticorpali alla mucosa cervicovaginale, un'osservazione particolarmente interessante per lo sviluppo di vaccini contro le malattie sessualmente trasmissibili [14, 15].

Meccanismi effettori

Le membrane mucose sono dotate di tre livelli di difesa contro la agenti estranei, avviata sul-



la base di pericolosità: (1) le cellule epiteliali prodotti dal muco e dai fattori anti-microbici o defensori; (2) le cellule del sistema immunitario innato (neutrofili, macrofagi, cellule NK-like, mastociti, CD) reclutati a livello delle mucose possono innescare una risposta immunitaria aspecifica immediata contro gli agenti patogeni; (3) I CD sono il collegamento tra innata e specifica e coinvolti all'inizio delle risposte immunitarie specifiche anti-infettivi e regolatorie.

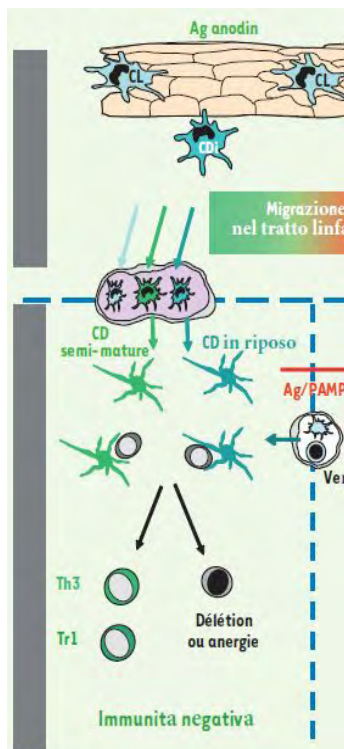
Risposte immunitarie protettive

Le difese immunitarie umorali specifiche delle superfici mucose immunitarie della superficie delle mucose sono controllate principalmente da immunoglobuline di secrezione del tipo IgA (S-IgA), dagli anticorpi predominanti delle secrezioni umane. La produzione di IgA specifiche si dirige contro i patogeni delle mucose o antigeni proteici solubili T-dipendenti. [16]. Le citochine, tra cui TGF- β e IL-10 prodotte dalle diverse cellule del tessuto della mucosa (cellule epiteliali ma anche fibroblasti e cellule dell'immunità innata) coinvolti, con le cellule T helper, alla commutazione isotipo dei linfociti B della mucosa e alla loro differenziazione in cellule del plasma secretorie di IgA. Ciò suggerisce l'importanza del microambiente della mucosa in questo fenomeno [17]. Le immunoglobuline di tipo IgM o IgG di origine mucosa di origine siero contribuiscono anche alle difese immunitarie della mucosa urogenitale e del tratto respiratorio.

I linfociti T citotossici (CTL) della mucosa sono cellule effettrici importanti per la difesa immunitaria contro alcune infezioni da parte di agenti patogeni (virus e parassiti intracellulari) [18, 19]. Così, dopo una vaccinazione orale, nasale, rettale o vaginale con tali antigeni in presenza di molecole immunostimolanti, cosiddetti adiuvanti, essenziali delle risposte CTL è espressa localmente, e in alcuni casi sistemica [20, 21]. I patogeni, o i vettori vivi attenuati, sono le più efficaci per indurre risposte T citotossica nei tessuti delle mucose. Le tossine batteriche native o i loro derivati detossificati possono stimolare anche l'induzione CTL [22]. La generazione dei linfociti T CD4⁺ ausiliari che potrebbe attivare i fagociti durante una infezione virale o batterica o dopo un'immunizzazione della mucosa con adiuvanti sembra essenziale per la difesa immunitaria contro alcuni virus o batteri. Pertanto, i topi deficienti al complesso maggiore di istocompatibilità di Classe II, immunizzati per via nasale, non sono protetti da infezione da *H. Pylori* [23].

Risposte immunitarie regolatorie

Il SIAM ha inoltre sviluppato le proprietà di tolleranza immunologica che permettono di controllare le reazioni infiammatorie contro la pletera di antigeni non patogeni presenti nell'ambiente. La tolleranza delle mucose è indotta da differenti meccanismi regolatori che includono la delezione o l'anergia dei linfociti attivi, o l'induzione dei linfociti T regolatori [24]. Diversi tipi di linfociti regolatori possono partecipare al controllo delle risposte della mucosa: (1) linfociti T specifici dell'antigene1; (2) linfociti T CD4⁺ CD25⁺ naturali (Treg) che controllano la proliferazione per contatto cellulare. Queste sembrano giocare un ruolo centrale nella differenziazione delle cellule T di tipo Tr1 o Th3-tipo [25]. Si noti che i linfociti T $\gamma\delta$ intraepiteliali ed i linfociti intraepatici possono anche partecipare, rispettivamente alla regolazione delle risposte immunitarie indotte per inalazione o per fagocitazione di antigene [26, 27]. Inoltre, alcuni macrofagi intestinali possono anche controllare l'infiammazione legata alla presenza di agenti patogeni da un meccanismo di anergia innato anti-infiammatorio, pur mantenendo l'attività battericida [28, 29].

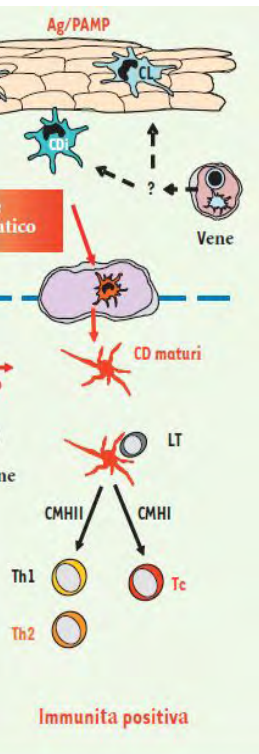


L'attivazione, l'espansione e la sopravvivenza di diversi linfociti effettori (protettori e/o regolatori) sono controllati dai CPAg. Di questi, infine, i CD che si trovano nel tessuto della mucosa svolgono un ruolo determinante. Il grado di differenziazione e la localizzazione dei tessuti di questi CD della mucosa e la natura dell'antigene quindi che catturano poi inducono ai linfociti, hanno un effetto maggiore sul/ sui tipo/i delle risposte immunitarie indotte, i quali agiscono sulle risposte produttive o di tolleranza [4, 30]. Questo è importante per lo sviluppo dei vaccini per la somministrazione alla mucosa, che non solo inducono al reclutamento ma anche la maturazione CD della mucosa.

Vaccini anti-infettivi

La maggior parte delle infezioni comincia con il contatto delle mucose e richiede spesso l'applicazione un vaccino nel sito penetrazione del patogeno per l'induzione di immunità protettiva. Questo è il caso delle infezioni gastrointestinali causate da *H. pylori*, *V. colera*, *E. coli*, *Shigella* spp, *Clostridium difficile*, rotavirus e calicivirus, per le infezioni respiratorie causate da *Mycoplasma pneumoniae*, per il virus dell'influenza e per il virus respiratorio sinciziale e, infine, per infezioni genitali sessualmente trasmissibili causate da HIV o virus herpes, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Si noti, tuttavia, che in alcuni casi, anche se non proteggendo l'ingresso dal patogeno, le IgG sistemiche sono sufficienti per la protezione (per esempio il poliovirus).

La sfida della vaccinazione della mucosa è far sì che una barriera immunitaria della mucosa si adatti al patogeno, costituito da S-IgA neutralizzati e/o linfociti T helper e citotossici. Gli anticorpi secretori possono bloccare la colonizzazione dell'epitelio della mucosa dai batteri non invasivi, o prevenire la fissazione tossine microbiche sulle cellule epiteliali, i linfociti T citotossici possono eliminare le cellule infette e prevenire la moltiplicazione microbica. Ad esempio, nei casi di infezioni gastrointestinali causate da *V. colera* ed ETEC (Enterotossina *E. coli*, responsabile delle diarree da viaggio), la produzione locale di S-IgA è fondamentale per la protezione dell'ospite e per l'induzione alla memoria immunologica. Nonostante il potenziale di attrazione della vaccinazione della mucosa, lo sviluppo di tale vaccini è limitata dalla mancanza di coadiuvanti idonei gli esseri umani in grado di indurre risposte secretorie e cellulari soddisfacenti. Oggi solo sei vaccini vengono comunemente somministrati attraverso la mucosa (per recensione vedi [31]).



La sfida della vaccinazione della mucosa è far sì che una barriera immunitaria della mucosa si adatti al patogeno, costituito da S-IgA neutralizzati e/o linfociti T helper e citotossici. Gli anticorpi secretori possono bloccare la colonizzazione dell'epitelio della mucosa dai batteri non invasivi, o prevenire la fissazione tossine microbiche sulle cellule epiteliali, i linfociti T citotossici possono eliminare le cellule infette e prevenire la moltiplicazione microbica. Ad esempio, nei casi di infezioni gastrointestinali causate da *V. colera* ed ETEC (Enterotossina *E. coli*, responsabile delle diarree da viaggio), la produzione locale di S-IgA è fondamentale per la protezione dell'ospite e per l'induzione alla memoria immunologica. Nonostante il potenziale di attrazione della vaccinazione della mucosa, lo sviluppo di tale vaccini è limitata dalla mancanza di coadiuvanti idonei gli esseri umani in grado di indurre risposte secretorie e cellulari soddisfacenti. Oggi solo sei vaccini vengono comunemente somministrati attraverso la mucosa (per recensione vedi [31]).

Vaccini anti-infiammatori

Il sistema immunitario si è evoluto per evitare risposte infiammatorie indesiderate attraverso diversi tipi di meccanismi di regolazione. La proprietà di tolleranza della mucosa dimostra di essere una strategia interessante per il controllo di patologie associate a risposte infiammatorie contro gli allergeni o i propri antigeni.

I vaccini contro malattie autoimmuni

L'induzione di tolleranza mucosa è specifica per l'antigene utilizzato, ma può avere un impatto non specifico localmente quando è dovuto alla produzione

di citochine regolatrici quali TGF- β e IL-10. In diversi modelli animali, è possibile impedire o ritardare l'insorgenza di malattie autoimmuni sperimentali, l'artrite reumatoide o il diabete tipo I [31, 32]. La dose di auto-antigene utilizzato, così come l'itinerario e la frequenza di somministrazione influenza la natura della risposta. Così, i linfociti sintetizzati IL-10 sono prodotti in ri-

sposta ad un antigene somministrato a basse dosi per via nasale, mentre lo stesso antigene stimola preferenzialmente linfociti produttori T di TGF- β quando somministrato per via orale. Tuttavia, grandi dosi di antigeni favoriscono l'anergia delle cellule T specifiche o addirittura la morte. Tale approccio terapeutico si è tuttavia dimostrato deludente negli esseri umani, in diversi studi clinici di fase III di induzione alla tolleranza per via orale, per esempio nel diabete di tipo I [33] o nella sclerosi multipla [34]. È difficile in questa fase se la natura e/o le dosi di autoantigeni usati sono responsabili dei risultati negativi ottenuti, o se questi risultati indicano che la tolleranza orale è inducibile rispetto al soggetto non sensibilizzato. Quest'ultima possibilità sembra improbabile date le diverse osservazioni. In effetti, la co-somministrazione per via orale o nasale di autoantigeni legati alla subunità B della tossina del colera (CTB), mirati vettori cellulari a proprietà tollerogeniche, promuove la tolleranza delle mucose in diversi modelli animali nelle condizioni sperimentali prestabilite [32].

Vaccini anti-allergici

Le allergie Tipo I sono dovute all'attivazione delle cellule T helper CD4+ specifiche di allergeni coinvolti nella differenziazione dei plasmociti IgE, queste immunoglobuline sono responsabili della patologia allergica. La strategia terapeutica attualmente utilizzata, chiamata immunoterapia anti-allergica specifica o desensibilizzazione, consiste nel somministrare per via sottocutanea con dosi crescenti e ripetute di allergeni per ridurre la produzione di IgE eliminando o deviando le risposte patologiche T CD4. L'immunoterapia per somministrazione di allergene sublinguale utilizzato nello studio fase clinica II / III, si è dimostrato efficace nei casi di rinite ed asma. Questa nuova strategia è non invasiva e permette l'auto-somministrazione allergeni. Inoltre, è interessante notare, che non si ha alcun episodio anafilattico segnalato anche quando sono somministrate alte dosi di allergeni per questa via. L'immunoterapia sublinguale è quindi un approccio raccomandato dalle linee guida dell'OMS dal 1998.

Gli estratti di allergene somministrati a dosi elevate sono stati utilizzati nella maggior parte degli studi clinici. Nuovi approcci stanno utilizzando la vaccinazione con analoghi peptidi di allergeni in combinazione con composti immunomodulanti somministrati per via mucosa potrebbe aumentare la sicurezza e l'efficacia di immunoterapia anti-allergia.

Ottimizzazione vaccini della mucosa

I vaccini della mucosa preventivi o terapeutici devono essere progettati per indirizzare il sistema immunitario locale. Il vaccino ideale deve: (1) conservare gli antigeni del vaccino dalla degradazione enzimatica o chimica e limitare la loro eliminazione o la diluizione eccessiva; (2) cellule bersaglio in grado di catturare l'antigene, le cellule epiteliali cella o le cellule dendritiche; (3) stimolare adeguatamente l'immunità innata e specifica al fine di indurre l'immunità specifica adatta.

Il sistema del targeting degli antigeni cellulari alla somministrazione della mucosa

Sono stati utilizzati una moltitudine di sistemi di targeting cellulari antigene: inclusi i vettori inerti (rivestimento dei vari complessi lipidici antigeni, particelle biodegradabili a base lattico o acido glicolico, proteine di trasporto che mirano alle cellule epiteliali o dendritiche), vettori virali (adenovirus, virus del morbillo o il vaiolo) o vettori batterici attenuati (derivato da *S. typhi*, *B. pertussis* o batteri commensali) [32]. Nonostante la loro efficacia di diversi modelli animali, per l'applicazione terapia umana non è stato ancora approvato nessuno di questi vettori. Si noti che l'utilizzo di pseudovirus o VLP (particelle virali manca l'acido nucleico), potenzialmente utili come vettori di target cellulari di antigeni proteici o DNA, ma anche di molecole immunostimolanti, indotta da risposte IgA secretorie e da risposte delle cellule T citotossiche della mucosa protettiva in diversi sistemi sperimentali di infezione della mucosa [36].

Adjuvanti della mucosa

La tossina del colera (CT) o l'enterotossina dell'E. coli (LT) termolabile sono gli adjuvanti della mucosa più potenti conosciuti fino ad oggi [32]. Molte opere hanno cercato di sviluppare tossine disintossicate per mantenere il potere adjuvante accettabile ed utilizzabile negli esseri umani. Tra questi derivati, il CTB ricombinante viene utilizzato per aumentare l'immunità secretoria o per indurre la tolleranza della mucosa contro autoantigeni o allergeni. Le mutazioni della subunità A tossici permettono di comprendere le mutazioni CT e LT che hanno un citotossicità ridotta ma il loro potere adjuvante è inferiore. Inoltre, il potere adjuvante di molecole contenenti PAMP, di cui sopra, sono in corso di valutazione e potrebbe essere la prossima generazione di adjuvanti. Tra questi PAMP, i DNA batterici non metilati (CpG) specifica del recettore TLR-9 sono promettenti e stimolano l'immunità innata e l'immunità specifica dopo la vaccinazione per via nasale, orale e genitale. È interessante notare che l'attività adjuvante delle molecole di tipo CpG sulle risposte della mucosa può essere altamente amplificato dal loro accoppiamento di CTB. [32]

Conclusioni e prospettive

I progressi metodologici degli ultimi dieci anni hanno permesso una migliore comprensione della SIAM. Tali progressi facilitano lo sviluppo di vaccini della mucosa anti-infettivi e anti-infiammatori e anti-allergici.

Lo sviluppo di un numero maggiore di vaccini della mucosa richiede l'accesso a vettori di trasporto e la consegna di antigeni ed additivi che permetteranno di stimolare e di guidare con precisione risposte immunitarie al fine di ottenere l'effetto desiderato, ad oggi l'Autovaccino sembra essere il modello più affidabile per l'assenza in primo luogo di reazioni sistemiche questo a discapito della totale eradicazione delle reazioni allergiche.

Gli sviluppi recenti in questi settori possono facilitare lo studio di nuovi vaccini della mucosa anti-infettive ed anti-infiammatori.

Queste formulazioni della mucosa devono però essere ancora valutati bene, negli esseri umani, la diversità genetica anche le differenze della flora intestinale e delle abitudini alimentari e dell'anamnesi immunologica sono fattori di differenziazione che non consentono di standardizzare processi vaccinatori sintetici o ricombinati con la stessa sicurezza ottenuta con gli autovaccini. In questo senso, alcuni vaccini della mucosa, come il vaccino orale contro la poliomielite o i vaccini orali contro il colera o il rotavirus e la febbre tifoide si sono dimostrati meno efficaci nei paesi in via di sviluppo piuttosto che in paesi industrializzati, questo dimostra la variabile sopra indicata.

Dott.Samoridno Peci PhD

Direttore del Centro Ricerche Cerifos Milano e
del laboratio Forschung Chemnitz Germany

References

1. Mestecky J, Lamm ME, Strober W, et al. *Mucosal immunology*, 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2005 : 1868 p.
2. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003 ; 3 : 331-41.
3. Kelsall BL, Leon F. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunology* 2005 ; 6 : 132-48.
4. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001 ; 2 : 725-31.
5. Salmi M, Jalkanen S. Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion and commitment. *Immunol Rev* 2001 ; 206 : 100-13.
6. Stagg AJ, Kamm MA, Knight SC. Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin. *Eur J Immunol* 2002 ; 32 : 1445-54.
7. Mora JR, Bono MR, Manjunath N, et al. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 2003 ; 424 : 88-93.
8. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, et al. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004 ; 21 : 527-38.
9. Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, et al. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 2005 ; 202 : 1063-73.
10. Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V, et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* 2005 ; 202 : 1051-61.
11. Lazarus NH, Kunkel EJ, Johnston B, et al. A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J Immunol* 2003 ; 170 : 3799-805.
12. Abonia JP, Hallgren J, Jones T, et al. Alpha-4 integrins and VCAM-1, but not MAdCAM-1, are essential for recruitment of mast cell progenitors to the inflamed lung. *Blood* 2006 ; 108 : 1588-94.
13. Quiding M, Nordstrom I, Kilander A, et al. Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses, gamma-interferon production, and evokes local immunological memory. *J Clin Invest* 1991 ; 88 : 143-8.
14. Kozlowski PA, Cu-Uvin S, Neutra MR, Flanigan TP. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect Immun* 1997 ; 65 : 1387-94.
15. Johansson EL, Wassén L, Holmgren J, et al. Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infect Immun* 2001 ; 69 : 7481-6.
16. Hornquist CE, Ekman L, Grdic KD, et al. Paradoxical IgA immunity in CD4-deficient mice. Lack of cholera toxin-specific protective immunity despite normal gut mucosal IgA differentiation. *J Immunol* 1995 ; 155 : 2877-87.
17. Goodrich ME, McGee DW. Regulation of mucosal B cell immunoglobulin secretion by intestinal epithelial cell-derived cytokines. *Cytokine* 1998 ; 10 : 948-55.
18. Kunisawa J, Kiyono H. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense. *Cell Mol Life Sci* 2005 ; 62 : 1308-21.
19. Franco MA, Greenberg HB. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol* 1995 ; 69 : 7800-6.
20. Klavinskis LS, Bergmeier LA, Gao L, et al. Mucosal or targeted lymph node immunization of macaques with a particulate SIVp27 protein elicits virus-specific CTL in the genito-rectal mucosa and draining lymph nodes. *J Immunol* 1996 ; 157 : 2521-7.
21. Luci C, Hervouet C, Rousseau D, et al. Dendritic cell-mediated induction of cytotoxic responses following intravaginal immunization with the non-toxic B subunit of cholera toxin. *J Immunol* 2006 ; 176 : 2749-57.
22. Simmons CP, Hussell T, Sparer T, et al. Mucosal delivery of a respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits protective, immunopathogenic, and immunoregulatory antiviral CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2001 ; 166 : 1106-13.
23. Ermak TH, Giannasca PJ, Nichols R, et al. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med* 1998 ; 188 : 2277-88.
24. Wu HY, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Res* 2003 ; 28 : 265-84.
25. Stassen M, Fondel S, Bopp T, et al. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol* 2004 ; 34 : 1303-11.
26. Hanninen A, Harrison LC. Gamma delta T cells as mediators of mucosal tolerance: the autoimmune diabetes model. *Immunol Rev* 2000 ; 173 : 109-19.
27. Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003 ; 3 : 51-62.
28. Smith PD, Oehsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* 2005 ; 206 : 149-59.
29. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005 ; 115 : 66-75.
30. Anjuere F, Luci C, Lebens M, et al. In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. *J Immunol* 2004 ; 173 : 5103-11.
31. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005 ; 11 : S45-53.
32. Holmgren J, Adamsson J, Anjuere F, et al. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett* 2005 ; 9 : 181-8.
33. Chaioullou L, Lefevre H, Thivolet C, et al. Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2000 ; 12 : 545-9.
34. Wiendl H, Hohlfeld R. Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials. *BioDrugs* 2002 ; 16 : 183-200.
35. Stanford M, Whittall T, Bergmeier LA, et al. Oral tolerization with peptide 336-351 linked to cholera toxin B subunit preventing relapses of uveitis in Behcet's disease. *Clin Exp Immunol* 2004 ; 137 : 201-8.
36. Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, et al. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol* 2003 ; 108 : 241-7.