



Uso dei probiotici ricombinanti nelle allergie

Claudia Petrarca

Unità di Allergologia e Immunotossicologia
Ce.S.I. - Ageing Research Center
Fondazione Università "G. d'Annunzio"
Chieti

Use of recombinant probiotics in allergy

Not Allergol 2014; vol. 32: n.1: 13-22.

INTRODUZIONE

L'immunoterapia specifica (ITS) è l'unica modalità di trattamento della patologia allergica mediate da IgE in grado di sopprimere, non solo le sue espressioni sintomatologiche, ma anche le cause che la determinano. In particolare, la ITS riequilibra l'assetto immunologico dei soggetti allergici, i quali sviluppano risposte immunitarie anomale mediate da IgE verso gli allergeni, proteine esogene normalmente innocue che entrano nell'organismo dall'ambiente esterno con l'alimentazione, la respirazione o l'assorbimento cutaneo. Alla base dell'efficacia della ITS vi sono meccanismi immunologici molto complessi e non ancora del tutto chiariti. Il ruolo centrale in questo scenario sarebbe ricoperto dalle cellule presentanti l'antigene (APC), tipicamente cellule dendritiche e macrofagi, che sarebbero indotte dalla ITS a maturare verso un fenotipo adatto a guidare la maturazione funzionale di

RIASSUNTO

Parole chiave e sigle

- Probiotico • LAB Lactobacilli • Bet v 1; ITS immunoterapia specifica
- ST Streptococcus thermophilus • Treg cellule T regolatorie • IgE • eosinofili

I batteri probiotici stimolano l'espressione delle molecole co-stimolatorie sulla superficie delle cellule dendritiche, la produzione di citochine T_H1 e l'attività delle cellule T regolatorie. In modelli murini di allergia, i probiotici prevengono o sopprimono le risposte T_H2 dannose e potenziano la ITS. I loro effetti immunomodulanti spiegherebbero la loro efficacia nella prevenzione delle patologie allergiche nei bambini e ne suggeriscono un possibile impiego nella ITS delle malattie allergiche. I vaccini antiallergici mucosali basati su probiotici esperimenti l'allergene potrebbero risultare vantaggiosi per la non invasività e l'effettivo trasporto ai siti di azione. Gli studi sull'uso di probiotici ricombinanti confermano le loro proprietà immunomodulanti in vivo, ma non chiariscono la loro capacità di indurre tolleranza immunologica e ridurre i sintomi. La possibilità di sequestro dell'allergene all'interno della cellula e, pertanto, non specificità della risposta evocata sono possibili limiti dei probiotici ricombinanti. Il nostro gruppo ha generato un probiotico con attività autolitica, in grado di produrre rBet v 1, trasportarlo e rilasciarlo nell'intestino. Topi BALB/c sono stati sensibilizzati verso rBet v 1 e trattati con il probiotico ricombinante e sottoposti a challenge respiratorio. Il probiotico ricombinante ha indotto aumento delle Treg, diminuzione del rapporto IgE/IgG2a, diminuzione della IL-4 indotta da rBet v 1, aumento di IL-10 e IFN-g, riduzione degli eosinofili nell'organo bersaglio. I dati indicano che il probiotico ricombinante trasporta l'allergene al GALT e induce la tolleranza, la deviazione immunologica e riduce l'infiammazione allergica.



SUMMARY

Key words and Acronyms

• Probiotic • LAB= Lactobacilli • Bet v 1 • SIT specific immune therapy • ST Streptococcus thermophilus • Tregs T regulatory cells • IgE • eosinophils

Research efforts to improve the efficacy of SIT involve the discovery of new adjuvants. Some strains of probiotic bacteria are able to induce up-regulation of co-stimulatory molecules in DCs, promote Th1 cytokines production and increase in Treg activity.

In mouse models, they have been shown to prevent or suppress the harmful T_H2 response and to potentiate allergoid-SIT.

This could explain the observed effectiveness of the prolonged administration of probiotics in the prevention of allergic disorders in infants and envisage the possible use of probiotics expressing the allergen for the SIT of allergic diseases.

Mucosal allergy vaccines based on live bacterial cells expressing the therapeutic allergen may advantageous for several reasons: (i) a non-invasive route of administration, (ii) the use of characterized recombinant allergens instead of undefined extracts, (iii) an easier production, and (iv) the effective transport to mucosal sites by microbial carriers with intrinsic adjuvant properties.

Few studies reported the development of SIT strategies based on recombinant bacteria expressing the allergen, mostly describing only favorable immunomodulatory properties, but not the development of immune tolerance or symptoms reduction. Limits of recombinant probiotics might be allergen sequestration inside the bacterial cell and lack of specificity of the immune response. Hence, we developed a novel SIT strategy based on a food-grade bacterium, with autolytic activity, owning the ability to induce a T_H1 skewing activity of the immune response, to produce the allergen intracellularly, and to release the allergen at intestinal level. The airborne allergen Bet v 1 from white birch pollen was used as a model. Hence, we evaluated Streptococcus thermophilus (ST) expressing rBet v 1 as allergen delivery tool and adjuvant factor for immunotherapy. rBet v 1 gene was introduced and expressed in ST (ST[rBet v 1]). BALB/c mice were sensitized with rBet v 1 and then treated with either ST alone, ST[rBet v 1], or the combination of ST and rBet v 1, for 20 days. After two aerosol challenges, Treg frequency, in vitro allergen-induced cytokines, rBet v 1-specific IgE and IgG2a and bronchial histology were made in harvested spleen, sera and lung. ST[rBet v 1] induced immunological and histological changes typical of successful SIT: increased frequency of Tregs and expression of Foxp3; decreased allergen-specific IgE/IgG2a; decrease of in vitro rBet v 1-induced IL-4 from spleen cells; increased allergen-induced IL-10 and IFN-g; drop of bronchial eosinophilia. ST and ST+rBet v 1 combination were ineffective in reducing bronchial eosinophilia, allergen induced IL-4 and rBet v 1-specific IgE/IgG2a ratio. ST[rBet v 1] has tolerogenic and T_H1 skewing properties and efficiently delivers the allergen to the GALT, restraining and readdressing the established specific T_H2 response.

linfociti naïve (T_H0) in linfociti T helper di tipo 1 (T_H1) oppure in cellule T regolatorie (Treg). Le APC promuovono questi due effetti attraverso il rilascio di pattern di citochine alternativi, IL-2 e IL-12 nel primo caso e IL-10 nel secondo. A loro volta, le cellule T_H1 , attraverso la loro citochina IFN-g, favoriscono la produzione di IgG₄, che vanno a competere con le IgE per il legame con l'allergene. Le citochine prodotte dalle Treg (IL-10 e TGF-b) hanno un'azione inibitoria che induce anergia o apoptosi nelle cellule T_H2 , con conseguente blocco della produzione della loro citochina caratteristica, IL-4, il fattore specifico che stimola i linfociti B alla produzione di IgE. Di conseguenza, i basofili e gli eosinofili non possono essere attivati a rilasciare mediatori dell'infiammazione allergica che, com'è noto, alimentano ed amplificano la sintomatologia; inoltre viene inibita la presentazione dell'antigene facilitata dalle IgE da parte delle APC e la stimolazione di cloni T_H2 specifici. Tutte queste modifiche immunologiche contrastano la risposta allergica e ripristinano risposte immunitarie non patologiche verso sostanze esogene innocue. L'effetto finale che si produce è la desensibilizzazione e la attenuazione o scomparsa dei sintomi allergici. Però la ITS, comportando la somministrazione di un allergene in forma nativa a scopo terapeutico, presenta un certo grado di rischio di anafilassi, specialmente quando è necessario raggiungere alte dosi per ottenere l'efficacia clinica.

Pertanto, l'impegno della ricerca scientifica per migliorare la sicurezza e l'efficacia della ITS nelle patologie allergiche



punta allo sviluppo di antigeni ipoallergenici (1,2), o a molecole adiuvanti (3), cioè sostanze in grado di stimolare il differenziamento e la proliferazione di linfociti Treg e T_H1 , e sostanze veicolanti che ne favoriscano una presentazione ottimale al sistema immunitario. Un esempio di trasferimento nella clinica di queste indagini è certamente rappresentato dagli allergoidi, molecole ottenute mediante modifica chimica delle proteine allergeniche in modo da ridurne l'affinità di legame per le IgE specifiche che, quando somministrate per via sublinguale, presentano rischio scarso o nullo di effetti indesiderati (4).

I BATTERI PROBIOTICI E I LATTOBACILLI

Da alcuni anni, diversi gruppi di ricerca, tra i quali il nostro, ha come oggetto di studio i batteri probiotici. I probiotici sono generalmente batteri commensali e/o simbiotici gram-positivi, resistenti all'ambiente gastrico e capaci di colonizzare in modo transiente l'intestino tenue e di creare con esso un sistema complesso, il microbiota, che contribuisce allo sviluppo dell'intestino e alla sua normale funzione fisiologica e rappresenta un possibile target per il trattamento delle malattie allergiche perché, essendo in grado di sviluppare risposte immunitarie regolatorie attraverso dell'induzione di IL-10 (5) può fornire stimoli adeguati per l'acquisizione della tolleranza verso gli antigeni. I batteri probiotici, potrebbero essere adatti a questo scopo. È stato dimostrato che certi ceppi di probiotici regolano l'omeostasi immunologica

della mucosa intestinale (6) e hanno un ruolo nello sviluppo delle malattie allergiche (7). Inoltre, studi epidemiologici hanno rivelato che la composizione della microflora intestinale e la prevalenza di atopia sono correlate (8). I lattobacilli (LAB) sono i principali batteri probiotici impiegati per la produzione di prodotti caseari e per le preparazioni commerciali di probiotici per l'uso umano; ciò è possibile perché essi non sono patogeni, non danneggiano le mucose, non possiedono geni per la antibiotico-resistenza e non sono degradati dagli acidi biliari (4). Perciò, l'uso dei LAB come elementi adiuvanti nell'immunoterapia allergene specifica rappresenta un approccio innovativo nella terapia desensibilizzante. Infatti, alcuni ceppi sono in grado di sopprimere la risposta T_H2 dannosa che caratterizza l'allergia (9). Il meccanismo alla base della soppressione della risposta T_H2 indotta dai LAB non è stato ancora completamente chiarito. Diversi studi in vitro e in vivo dimostrano che certi specifici ceppi di lattobacilli, ma non tutti, possiedono

proprietà adiuvanti del sistema immunitario, come ad esempio la capacità di attivare le DC e indurre la produzione di citochine TH1, inibire la produzione di citochine TH2 e ridurre la produzione di IgE (10) (Tabella 1).

In modelli murini di allergia è stato dimostrato che vari ceppi sono in grado di indurre cellule Treg (11) e le loro citochine inibitorie IL-10 and TGF- β (12) e anche protezione dalla risposta infiammatoria allergica delle vie aeree (13). All'origine di queste modifiche immunologiche vi sarebbero complesse interazioni tra i probiotici e le cellule dell'ospite, cioè le cellule epiteliali intestinali (IEC) e le cellule dendritiche (DC). L'avvicinamento tra i probiotici e le DC residenti nella lamina propria potrebbe avvenire nel lumen intestinale, grazie alla protrusione dei prolungamenti dendritici attraverso lo strato di IEC, oppure nella "dome region" del tessuto linfoide associato all'intestino (GALT), dove i probiotici sarebbero trasferiti attraverso cellule epiteliali specializzate (cellule M). Il contatto avverrebbe mediante molecole esposte sulle superfici cellulari, come i Pattern Molecolari Associati ai Microorganismi (MAMP) e i Toll-like receptors (TLR) e DC-SIGN delle DC; il legame tra ligando e recettore induce le DC a maturare e a produrre due possibili tipi alternativi di citochine, IL-12 oppure IL-10 e TGF- β , fondamentali per la polarizzazione delle cellule naive $T CD4^+$ (T_H0) rispettivamente verso cellule T_H1 o Treg (14) (Figura 1).

Questi dati giustificano lo studio *in vitro* e *in vivo* di nuovi ceppi di latto-

Petrarca C, Clemente E,
Toto V, Iezzi M, Rossi C,
Zanotta S, Mistrello G,
Zanoni I, Granucci F, Arioli S,
Mora D, Guglielmetti S,
Paganelli R, Di Gioacchino M

rBet v 1 immunotherapy of sensitized mice with *Streptococcus thermophilus* as vehicle and adjuvant.

Human Vaccines & Immunotherapeutics.
2014;10(5): in stampa.



Tabella 1

Effetti di diversi ceppi probiotici nei meccanismi delle patologie allergiche in modelli sperimentali

Ceppo probiotico	Effetto studiato	Risultato
<i>Bfdbm lactis/bifidum</i> ; <i>Lctbs acidophilus</i> ; <i>Bfdbm bifidum/infantis</i> ; <i>Lctbs lactis</i> ; <i>Bfdbm longum</i> ; <i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>Bfdbm bifidum</i> (più potente polarizzatore DC)	Bilancio Th1/Th	▼
<i>Lctbs rhamnosus GG (LGG)</i> <i>Lctbs casei</i> <i>Bfdbm bifidum</i>	Bilancio Th1/Th2	▲
<i>Lctbs reuteri/casei</i>	Attivazione MD-DC	▲
<i>Bfdbm lactis/bifidum</i> ; <i>Lctbs acidophilus</i> ; <i>Bfdbm longum</i> ; <i>Bfdbm lactis Bb-12</i> ; <i>LGG</i> ; <i>Bfdbm bifidum</i> ; <i>Lctbs acidophilus</i>	Produzione IgE	▼
<i>Bfdbm</i>	Attivazione DC in neonati	▲
<i>Lctbs rhamnosus</i>	Modulazione della funzione delle DC	▲
<i>Bfdbm bifidum/infantis</i> ; <i>Lctbs salivarius</i>	Attivazione TLR-2	▲
<i>Lctbs reuteri</i>	Attivazione TLR-9	▲
<i>Bfdbm bifidum</i> ; <i>Lctbs acidophilus</i>	Produzione TGF-β	▲
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Inibizione risposte specifiche delle cellule T	▲

▲ : aumento dei sintomi o effetti negativi;

▼: diminuzione dei sintomi o effetti positivi; Bfdbm: Bifidobacterium; Lctbs: Lactobacillus; LGG: *Lctbs rhamnosus GG*; Th1: T helper type 1; IL: interleuchina; TGF: transforming growth factor; IFN: interferone.

Tratto da: Ozdemir O- Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *Clin Exp Immunol.* 2010;160(3):295-304.

bacilli che possano migliorare l'efficacia terapeutica dei vaccini antiallergici per la ITS.

I lattobacilli possiedono proprietà immunomodulanti che coinvolgono cellule T effettrici e regolatorie anche nell'uomo; nonostante ciò, l'applicazione clinica dei lattobacilli nelle malattie allergiche è ancora controversa. Infatti, alcuni trials clinici hanno dimostrato che la somministrazione di lattobacilli previene l'insorgenza di malattie allergiche nella prima infanzia (15-17), ma altri studi non hanno riscontrato alcun effetto o solo effetti a breve termine (17,18). Alcuni studi clinici in adulti affetti da dermatite atopica o rinite allergica, i lattobacilli hanno prodotto una modulazione della risposta immunitaria (19,20) e, in uno di questi, anche riduzione dei sintomi nasali (20); invece, essi si sono rivelati inefficaci nell'asma allergica (21). Anche in pazienti con rinite allergica trattati con lattobacilli non è stato osservato alcun miglioramento dei sintomi, sebbene si fosse manifestato un chiaro spostamento T_H2-T_H1 e l'induzione di Treg (22).

E' possibile che l'assenza di remissione clinica sia dovuta al fatto che i probiotici evocano risposte immunologiche che sono indipendenti dall'allergene e, quindi, non specifiche per esso. Ciò potrebbe limitare l'efficacia clinica durevole del trattamento, per l'ottenimento del quale è fondamentale la tolleranza immunologica che viene instaurata da cellule Treg specifiche per l'antigene (23). E' stato quindi ipotizzato che l'effetto immunomodulante dei probiotici potesse essere reso specifico e più po-



tente mediante somministrazione congiunta con l'allergene. È possibile però che una semplice associazione vaccino-probiotico possa non risultare efficace a seguito della degradazione enzimatica cui è esposto l'allergene somministrato oralmente, che finora ha reso inefficace qualsiasi approccio di ITS con questa modalità. In questo caso, l'associazione del probiotico con un allergoide, piuttosto che con allergene, potrebbe risultare più adatta. A sostegno di questo concetto, in un nostro studio precedente, abbiamo dimostrato che l'efficacia della ITS basata su allergoide Amb a 1 di Ambrosia è potenziata dalla co-somministrazione del lattobacillo *Lactobacillus paracasei* Lp6 (24).

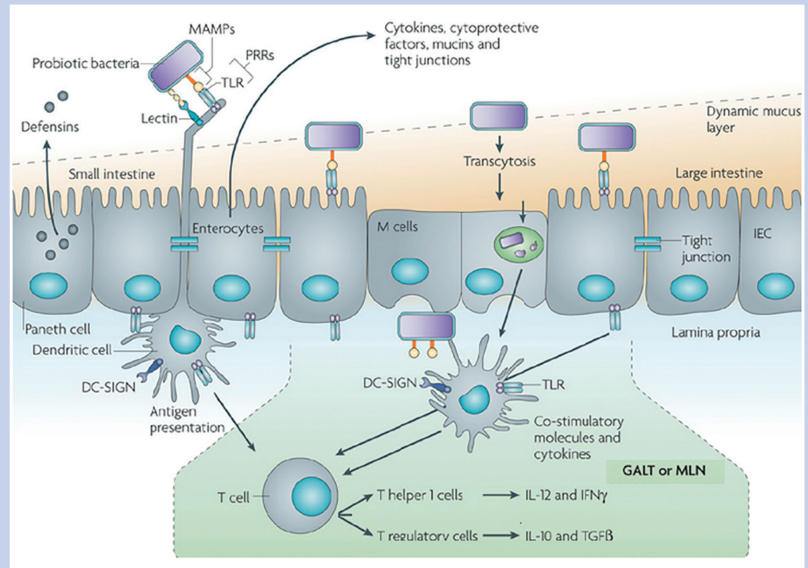
Un'altra opportunità per lo sviluppo di un vaccino antiallergico più sicuro ed efficace, da poter somministrare per via orale, è data dai probiotici ricombinanti produttori l'allergene.

I PROBIOTICI RICOMBINANTI

I probiotici sono microorganismi che possono essere modificati (trasformati) per produrre al loro interno o in forma secreta proteine esogene, per ottenere probiotici ricombinanti. I probiotici ricombinanti esprimenti allergeni potrebbero rappresentare vaccini innovativi con caratteristiche di efficacia potenziate o potenziabili per l'applicazione in protocolli di ITS.

Grazie alla tecnologia del DNA ricombinante e dell'ingegneria genetica, oggi è possibile produrre grandi quantità di proteine pure e in forma nativa o muta-

Figura 1 Interazioni dei batteri probiotici con il GALT



Tratta da Latvala S, Miettinen M, Kekkonen RA, et al. - *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* induce suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene expression directly and indirectly via interleukin-10 in human primary macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2011;165(1):94-103.

ta, inclusi gli allergeni utilizzando come "incubatori" naturali per la produzione microorganismi quali batteri, anche quelli probiotici. Mediante questa tecnologia una qualunque sequenza di DNA può essere inserita, per esempio, all'interno di un vettore di espressione batterico che viene a sua volta introdotto nel batterio che lo trascrive e traduce in catena polipeptidica all'interno della sua cellula o la secerne nel mezzo di coltura. Inoltre, mediante la mutagenesi sito-specifica, è possibile modificare in modo mirato tratti della sequenza del gene per ottenere proteine con attività

modificate. Nel caso degli allergeni, è possibile ottenere molecole ipoallergeniche che mantengano la loro immunogenicità.

Un probiotico ricombinante esprimente un allergene potrebbe essere utile impiegato come vaccino antiallergico, con aspetti innovativi rispetto alle terapie convenzionali e all'uso del solo probiotico o della associazione probiotico e allergene perché: (i) potrebbe essere agevolmente somministrato in modo non invasivo, per via orale, (ii) la cellula probiotica proteggerebbe l'allergene dalla degradazione proteolitica e lo rilascerebbe



Tabella 2

Panoramica degli studi sui probiotici ricombinanti nell'allergia sperimentale

Protocollo	Probiotico	Allergene ricombinante	Sito di vaccinazione	Modello di sensibilizzazione allergica	Effetti immunologici (e sintomatologici)	Riferimenti bibliografici
PROFILASSI IN TOPI ADULTI	Lactococcus lactis	BLG	Intragastrica	Topi BALB/c	↓ IgE specifiche ↑ IgG2a specifiche ↑ IFN-γ Effetti correlano con livelli di BLG espressa da L. lactis	(Ref. 25)
	Lactobacillus plantarum; Lactococcus lactis	Bet v 1	Intranasale	Topi BALB/c	↓ IgE specifiche ↑ IgG2a specifiche ↓ IgG1/IgG2a ↓ Eo in BALF e ↓ IL-5 in BALF ↑ sIgA specifiche in polmone e intestino	(Ref. 26)
	Lactococcus lactis	OVA	Intragastrica	Topi BALB/c (TCR specifico per OVA)	↓ risposta locale e sistemica; ↑ linfociti T CD4(+)/CD25(-); ↑ IL-10 ↓ IFN-γ in splenociti riattivati in vitro; ↑ Foxp3 e CTLA-4 in Treg	(Ref. 27)
	Lactobacillus plantarum;	Der p 1	Intranasale	Topi BALB/c	↑ IgG2a specifiche ↓ Eo in BALF e ↓ IL-5 in BALF	(Ref. 28)
PROFILASSI PRENATALE E NEONATALE	Lactobacillus plantarum NCIMB8826	Bet v 1	Colonizzazione delle madri	Topi BALB/c (madri in gestazione)	Nei neonati Pre sensibilizzazione: profilo Th1 (IFN-γ da splenociti stimolati in vitro con Ag). Post sensibilizzazione: ↓ IL-4 e IL-5 in cellule SP and MLN riattivate in vitro con Bet v 1; ↓ IgE, IgG1, IgG2a specifiche nel siero; ↑ Foxp3 mRNA in splenociti	(Ref. 29)
	Lactobacillus paracasei NCC 2461	Bet v 1	Orale	Topi BALB/c (madri in gestazione o lattazione)	Nei neonati: ↓ Eo nei polmoni; ↓ IL-5 nel BAL, polmoni e linfonodi mediastinici in vitro; = IgE, IgG; ↓ IL-4 e IL-5 in splenociti riattivati in vitro con Bet v 1 o ConA; ↑ Foxp3 mRNA polmone; ↑ TGF-β nel siero; ↓ infiammazione peribronchiale e muco	(Ref. 30)
TERAPIA IN TOPI ADULTI	Lactobacillus plantarum	Der p 1 (peptide)	Mucosale	Topi C57BL/6 J	↓ IFN-γ (non specifica) ↓ IL-5 (specifica)	(Ref. 31)
	Lactobacillus acidophilus	Der p 5	Orale	Topi BALB/c	↓ IgE specifiche ↑ IgG specifiche ?? ↓ Eo in BALF e ↓ Risposta ipereattiva delle vie respiratorie (AHR)	(Ref. 32)
	Lactococcus lactis	Beta-lattoglobulina bovina (BLG)	Intranasale	Topi BALB/c	↓ IgG1 in BAL; ↓ IL-4 ↑ IFN-γ in splenociti riattivati in vitro; ↓ risposta locale a challenge nasale	(Ref. 33)



legenda Tabella 2

- BAL** lavaggio broncoalveolare
- Der p 5** *Dermatophagoides pteronyssinus* group-5 allergen
- BLG** beta-lactoglobulina bovina
- OVA** ovalbumina
- Bet v 1** allergene maggiore del polline di *Betulla*
- ConA** Concanavalina A
- TCR** T-cell receptor
- Cry j 1** allergene maggiore del polline di cedro giapponese
- Der p 1** epitopo T immunodominante del *D. pteronyssinus*

be *in situ*, (iii) e quindi consentirebbe di veicolare l'allergene nei distretti immunologici dove si sviluppa la tolleranza immunologica, i linfonodi mesenterici e le placche del Peyer dove (iii) insieme al probiotico potrebbe esercitare la sua azione immunomodulante in modo favorevole e specifico (Figura 1).

Un aspetto molto interessante di questo tipo di approccio è la possibilità di ottenere, grazie all'accumulo dell'allergene all'interno della cellula del probiotico, alte concentrazioni locali di allergene che potrebbero rendere il vaccino efficace a dosi cumulative di allergene più basse, con riduzione del rischio di effetti secondari di tipo anafilattico.

Fino ad oggi solo un numero limitato di studi riportano lo sviluppo di strategie di SIT basate sull'uso di batteri ricombinanti esprimenti l'allergene (25-33), e nessuno di questi è stato ancora traslato all'uomo.

Gli studi pre-clinici in modelli murini di allergia dimostrano i probiotici ricom-

binanti presi in esame sono in grado di contrastare il processo di sensibilizzazione allergica con le opportune modifiche immunologiche, sia in topi neonati che adulti, quando il trattamento è somministrato come profilassi. Però, negli studi riguardanti i topi maturi non sono forniti dati circa l'induzione di Treg e la risposta infiammatoria locale dopo challenge respiratorio. Invece, i due studi sui neonati rilevano anche l'aumento di Foxp3, il fattore di trascrizione che identifica specificamente cellule Treg e, nella prole di madri trattate durante la gestazione e la lattazione, anche riduzione della reattività bronchiale. In questi due casi però, fenomeno di tolleranza coinvolge, l'educazione del sistema immunitario nel corso della sua maturazione, con effetti sull'immunità innata e sulle cellule Treg naturali (che non

sono antigeni specifiche, ma che potrebbero avere un effetto aspecifico anche su risposte verso uno specifico allergene), un processo molto diverso da quello che deve instaurarsi in soggetti adulti già sensibilizzati che richiede l'intervento dell'immunità adattativa e delle cellule T regolatorie inducibili e specifiche per l'allergene. Infine, in topi adulti già sensibilizzati l'uso dei probiotici ricombinanti somministrato secondo una modalità terapeutica è associato, in due studi su tre, alla riduzione dei sintomi dell'infiammazione allergica, ma non è chiarito il coinvolgimento delle cellule T regolatorie nell'effetto osservato (Tabella 2).

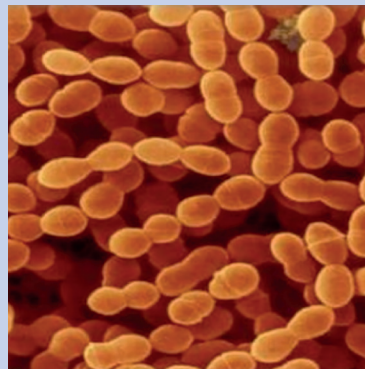
Gli studi preclinici appena descritti confermano l'effetto adiuvante dei probiotici ricombinanti nella prevenzione e nella terapia delle allergie, ma non chiariscono se essi siano degli strumenti vaccinali validi in grado di stimolare la tolleranza immunologia mediata da Treg duratura verso l'allergene.

Per questo motivo, recentemente, anche il nostro gruppo ha svolto uno studio *in vivo* utilizzando un ceppo probiotico dalle caratteristiche peculiari, non trascurando di valutare la risposta Treg e la risposta a livello polmonare.



Figura 2

Il lattobacillo probiotico *Streptococcus thermophilus*



M/E (fattore di ingrandimento: 1000x).

**IL NOSTRO STUDIO
CON UN LATTOBACILLO
RICOMBINANTE**

Per questo motivo, recentemente, anche il nostro gruppo ha svolto uno studio *in vivo* utilizzando un ceppo probiotico dalle caratteristiche peculiari, non trascurando di valutare la risposta Treg e la risposta a livello polmonare. In partico-



Tabella 3

Effetti desensibilizzanti del probiotico ricombinante rBet v 1

Gruppo	Trattamento		Siero			Splenciti in vitro (risposta specifica verso rBet v 1)			Milza	Polmoni
			IgE Anti-rBet v 1	IgG2a Anti-rBet v 1	IgE/IgG2a	IL-4	IL-10	IFN- γ	Treg	Eo
Naïve	nessuno	nessuno	+	-	+	+	+	++	++	-
Sensibilizzati	3x i.p.	nessuno	++++	-	++++	++++	+	++	++	+++
Probiotico	3x i.p.	15x i.g.	++++	+	++++	+++++	++	++	++	++
Probiotico ricombinante esprimente rBet v 1	3x i.p.	15x i.g.	++	++	++	++	+++++	++++	+++	+
Probiotico + rBet v 1	3x i.p.	15 x i.g.	++++	+	+++	++++	++	++++	++	++

lare nello studio è stato utilizzato come sistema di trasporto e rilascio dell'allergene ricombinante Bet v 1, un ceppo del batterio *Streptococcus thermophilus* (ST) (Figura 2), un lattobacillo omofermentativo che rappresenta il più importante starter (innesco) termofilo dei prodotti caseari usato nella produzione di yogurt e formaggi ed è quindi abitualmente introdotto nel nostro organismo con l'ingestione di tali alimenti.

La scelta del ceppo ST è stata dettata da una serie di considerazioni:

a) abbondante presenza di peptidoglicani nella parete cellulare e, in aggiunta come un batterio gram-positivo, possiede un rivestimento di acidi (lipo)teicoici, noti per esprimere attività immunomodulatorie.

b) carattere autolitico in virtù del fatto che contiene un batteriofago lisogeno che esprime un enzima in grado di degradare la parete batterica; questo fa sì

che una volta che il lattobacillo ST arriva nell'intestino tenue si verifica la sua completa lisi, con conseguente liberazione delle molecole in esso contenute. c) è un sistema procariotico di espressione adatto ad integrare stabilmente ed esprimere geni estranei.

Si può quindi ipotizzare che l'impiego in campo allergologico di un lattobacillo ST ricombinante funzioni come un sistema di trasporto e "dosatore" dell'allergene a livello del tessuto linfoide associato all'intestino tenue (GALT), dove potrebbe esprimere il suo potenziale effetto immunomodulatore e inibire la risposta allergica. Il fatto di usare nella "costruzione" del probiotico ricombinante un ceppo di lattobacillo che non sia in grado di riprodursi in virtù del suo carattere autolitico e quindi di colonizzare l'intestino con il conseguente rischio di trasferimento di antibiotico-resistenza, renderebbe lo stesso partico-

larmente sicuro e adatto ad un impiego terapeutico nell'uomo.

Nello studio si è provveduto inizialmente a generare un ceppo di *Streptococcus thermophilus* in grado di esprimere stabilmente il Bet v 1, l'allergene maggiore del polline di *Betula verrucosa* e successivamente a verificarne il suo eventuale effetto adiuvante e/o terapeutico in topi Balb/c resi IgE-responsive verso lo stesso Bet v 1, somministrandolo per via orale secondo un protocollo di immunoterapia.

Il livello di immunomodulazione e l'efficacia terapeutica del probiotico ricombinante ST[rBet v 1] è stato verificato e confrontato con gli effetti del solo ST e della associazione di ST+rBet v 1, misurando vari parametri immunologici ed istopatologici (citochine nel siero e prodotte da cellule del sistema immunitario *in vitro*, cellule Treg, cellule e citochine dell'infiammazione allergica nel tessuto polmonare).



I risultati dello studio, come riassunto nella Tabella 3, hanno dimostrato che il trattamento con il probiotico ricombinante ST[rBet v 1] produce effetti specifici, locali e sistemici quali: (i) riduzione di IgE anti-Bet v 1 nel siero e aumento del rapporto IgE/IgG2a, (ii) riduzione di IL-4 e aumento di IFN-g e IL-10 da parte di splenociti ristimolati in vitro con l'allergene, (iii) riduzione della infiammazione eosinofila dei polmoni dipendente dall'allergene che, nel topo, caratterizza la risposta infiammatoria dell'asma allergica. In confronto al solo probiotico ST e al trattamento associato probiotico e allergene ST+rBet v 1, il ricombinante ha prodotto la risposta IL-10 specifica per l'allergene più elevata, e non trattati.

CONCLUSIONI

Lo studio dimostra che il lattobacillo probiotico *Streptococcus thermophilus* esprime l'allergene rBet v 1 somministrato per via orale induce una significativa riduzione della reazione infiammatoria allergica T_H2 in topi sensibilizzati, con uno spostamento verso risposte immunitarie specifiche T_H1 e Treg. Questi risultati suggeriscono che il probiotico ricombinante autolitico protegga l'allergene dagli enzimi proteolitici del tratto gastro-intestinale e che lo rilasci, immunologicamente attivo, direttamente nell'intestino, dove stimola le cellule immunitarie residenti, determinando la deviazione T_H2 - T_H1

osservata dei pattern di citochine e il differenziamento e proliferazione di cellule Treg specifiche. Quindi, il probiotico ricombinante agisce da veicolo, dispensatore e adiuvante per l'allergene. Quest'ultimo, a sua volta, fornisce specificità alle cellule effettrici e regolatorie evocate per il raggiungimento dell'effetto terapeutico. I risultati del presente studio seppur preliminari rafforzano il concetto che i probiotici ricombinanti possano costituire dei validi candidati per il trattamento di patologie allergiche umane, favorendo probabilmente una migliore aderenza alla terapia sia per la semplicità di somministrazione che per la prevedibile riduzione dei costi di produzione.



Bibliografia

1. Di Gioacchino M, Cavallucci E, Ballone E, et al.- Dose-dependent clinical and immunological efficacy of sublingual immunotherapy with mite monomeric allergoid. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012; 25:671-679.
2. Di Gioacchino M, Perrone A, Petrarca C, et al.- Early cytokine modulation after the rapid induction phase of sublingual immunotherapy with mite monomeric allergoids. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008;21:969-976.
3. Baris S, Kiykim A, Ozen A, et al.- Vitamin D as an adjunct to subcutaneous allergen immunotherapy in asthmatic children sensitized to house dust mite. *Allergy* 2014; 69: 246-253.
4. Bagnasco M, Passalacqua G, Villa G, et al.- Pharmacokinetics of an allergen and a monomeric allergoid for oromucosal immunotherapy in allergic volunteers. *Clin Exp Allergy* 2001;31:54-60.
5. Veenbergen S, Samsom JN- Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL-10-producing regulatory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(3):269-276.
6. Artis D- Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):411-420.
7. Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, et al.- The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy* 2007;62(11):1223-1236.
8. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, et al.- Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(1):129-134.
9. Smelt MJ, de Haan BJ, Bron PA, et al.- *L. plantarum*, *L. salivarius*, and *L. lactis* attenuate Th2 responses and increase Treg frequencies in healthy mice in a strain dependent manner. *PLoS One*. 2012;7(10):e47244.
10. Hisbergues M, Magi M, Rigaux P, et al.- In vivo and in vitro immunomodulation of Der p 1 allergen-specific response by *Lactobacillus plantarum* bacteria. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(9):1286-1295.
11. Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, et al.- Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(5):811-819.
12. von der Weid T, Bulliard C, Schiffrin EJ- Induction by a lactic acid bacterium of a popula-



Bibliografia

- tion of CD4(+) T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:695-701.
13. Feleszko W, Jaworska J, Rha RD, et al.- Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(4):498-505.
14. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, et al.- Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(8):2880-5.
15. West CE, Hammarström ML, Hernell O- Probiotics in primary prevention of allergic disease--follow-up at 8-9 years of age. *Allergy*. 2013;68(8):1015-1020.
16. Wickens K, Black P, Stanley TV, et al.- A protective effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 against eczema in the first 2 years of life persists to age 4 years. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(7):1071-1079.
17. Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, et al.- Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003;361(9372):1869-1871.
18. Gore C, Custovic A, Tannock GW, et al.- Treatment and secondary prevention effects of the probiotics *Lactobacillus paracasei* or *Bifidobacterium lactis* on early infant eczema: randomized controlled trial with follow-up until age 3 years. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(1):112-122.
19. Drago L, Toscano M, De Vecchi E, et al.- Changing of fecal flora and clinical effect of *L. salivarius* LS01 in adults with atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46 Suppl:S56-63.
20. Wassenberg J, Nutten S, Audran R, et al.- Effect of *Lactobacillus paracasei* ST11 on a nasal provocation test with grass pollen in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(4):565-573.
21. Helin T, Hahtela S, Hahtela T- No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy*. 2002;57(3):243-256.
22. Perrin Y, Nutten S, Audran R, et al.- Comparison of two oral probiotic preparations in a randomized crossover trial highlights a potentially beneficial effect of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 in patients with allergic rhinitis. *Clin Transl Allergy*. 2014;4(1):1. [Epub ahead of print].
23. Ahangarani RR, Janssens W, VanderElst L, et al.- In vivo induction of type 1-like regulatory T cells using genetically modified B cells confers long-term IL-10-dependent antigen-specific unresponsiveness. *J Immunol*. 2009;183(12):8232-8243.
24. Petrarca C, Lazzarin F, Lanuti P, et al.- *Lactobacillus paracasei* Lp6 favors immune modulation induced by allergoid treatment in ragweed sensitized mice. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(4):881-893.
25. Adel-Patient K, Ah-Leung S, Creminon C, et al.- Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine beta-lactoglobulin partially prevents mice from sensitization. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(4):539-546.
26. Daniel C, Repa A, Wild C, et al.- Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. *Allergy*. 2006;61:812-819.
27. Huibregtse IL, Snoeck V, de Creus A, et al.- Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* secreting ovalbumin. *Gastroenterology*. 2007;133(2):517-528.
28. Rigaux P, Daniel C, Hisbergues M, et al.- Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy. *Allergy* 2009;64:406-414.
29. Schwarzer M, Repa A, Daniel C, et al.- Neonatal colonization of mice with *Lactobacillus plantarum* producing the aeroallergen Bet v 1 biases towards Th1 and T-regulatory responses upon systemic sensitization. *Allergy*. 2011;66(3):368-375.
30. Schabussova I, Hufnagl K, Tang ML, et al.- Perinatal maternal administration of *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 prevents allergic inflammation in a mouse model of birch pollen allergy. *PLoS One*. 2012;7(7):e40271.
31. Kruisselbrink A, Heijne Den Bak-Glashouwer MJ, Havenith CE, et al.- Recombinant *Lactobacillus plantarum* inhibits house dust mite-specific T-cell responses. *Clin Exp Immunol*. 2001;126(1):2-8.
32. Charng YC, Lin CC, Hsu CH- Inhibition of allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity by recombinant lactic-acid bacteria. *Vaccine*. 2006;24(33-34):5931-5936.
33. Cortes-Perez NG, Ah-Leung S, Bermúdez-Humarán LG, et al.- Allergy therapy by intranasal administration with recombinant *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;150(1):25-31.
34. Latvala S, Miettinen M, Kekkonen RA, et al.- *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* induce suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene expression directly and indirectly via interleukin-10 in human primary macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2011;165(1):94-103.