



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
APPLICATE

TESI DI LAUREA

ESTRATTI VEGETALI E PROBIOTICI NELLE DISBIOSI INTESTINALI
ASSOCIATE AD ALLERGIE ALIMENTARI

RELATORE: CHIAR.MO PROF Paola Brun

LAUREANDO: Alessia Toniolo

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

Introduzione	3
1. Il microbiota intestinale	4
1.1 Evoluzione del microbiota nel corso della vita dell'individuo	4
1.1.1 <i>Composizione del microbiota nelle prime fasi di vita: gravidanza, parto, allattamento e svezzamento</i>	8
1.1.2 <i>Composizione del microbiota intestinale nell'adulto</i>	13
1.2 Funzioni del microbiota intestinale	15
1.3 Fattori di disbiosi	16
1.4 Il sistema immunitario	19
1.4.1 <i>Meccanismo d'azione del sistema immunitario</i>	21
1.5 Le allergie alimentari	26
1.5.1 <i>Relazione tra il microbiota intestinale e le allergie alimentari</i>	28
1.5.2 <i>Allergia al latte</i>	29
1.5.3 <i>Allergia alle uova</i>	30
1.5.4 <i>Allergia alla tropomiosina di gamberetti</i>	31
2. Probiotici nelle allergie alimentari	33
2.1 Materiali e metodi utilizzati nella ricerca degli studi analizzati	33
2.2 Studi che supportano l'utilizzo di probiotici nelle allergie alimentari	34
2.2.1 <i>Probiotici nell'allergia al latte</i>	36
2.2.2 <i>Probiotici nell'allergia alle uova</i>	40
2.2.3 <i>Probiotici nell'allergia alla tropomiosina dei gamberetti</i>	43
3. Estratti vegetali nelle allergie alimentari	48
3.1 Materiali e metodi utilizzati nella ricerca degli studi analizzati	48
3.2 <i>Scutellaria baicalensis L.</i> nell'allergia alle uova	49
3.3 Il resveratrolo nell'allergia alle uova	53
3.4 La curcumina nell'allergia alle uova	55
3.5 Il licopene nell'allergia alle uova	58
3.6 La quercetina nell'allergia all'uovo	61
3.7 L-teanina ed epigallocatechina gallato nell'allergia alle uova	64
3.8 Epigallocatechina gallato e acido clorogenico nell'allergia a tropomiosina	68
Conclusioni	69

Introduzione

“Il piacere della tavola è di tutte le età, di tutte le condizioni sociali, di tutti i paesi e di tutti i giorni; può associarsi a tutti gli altri piaceri, e resta ultimo a consolarci della loro perdita.”
(Anthelme Brillat-Savarin)

Sono proprio queste parole a darci una lezione su quello che il cibo rappresenta. Il cibo è storia, è cultura, racconta la nostra tradizione, ciò che ci caratterizza, in fondo, “siamo ciò che mangiamo” (Feuerbach L., 1804-1872).

Da quando veniamo al mondo il cibo è uno degli aspetti fondamentali, si pensi solo all’importanza del latte materno (primo alimento) che fornisce al bambino tutta l’energia per crescere, ma non soffermiamoci solo su questo punto di vista, sarà proprio quel primo alimento che sarà alla base del contatto tra neonato e madre e che conseguentemente costruisce un rapporto di fiducia e affetto tra le due parti.

Si nasconde molto di più sotto il termine “cibo”, perfino il nostro corpo ha basato uno dei cinque sensi su di esso, il piacere del gusto che porta con sé tutta una serie di emozioni e appagamento. È proprio nei momenti di pausa della giornata che il cibo viene ad essere il motivo del distacco dalla tipica vita frenetica, è alla base di una semplice tavolata di persone che si riunisce per stare in compagnia, di un invito a cena, è il benessere di ogni giorno in tutti i sensi; se non c’è cibo non c’è vita!

E se fosse proprio il cibo a rendere più complicate le cose?

Purtroppo ci ritroviamo molto spesso davanti a circostanze per le quali alcuni alimenti vengono ad essere il vero nemico della situazione. Sempre più soggetti soffrono di allergie alimentari; in questi casi non esiste altro modo se non togliere dalla propria dieta il piacere di determinati alimenti che possano contenere tracce dell’allergene. Immaginate se potessimo fare qualcosa di più del semplice concetto di eliminare, di svelare a queste persone che c’è una soluzione!

È proprio per questo motivo che ho voluto focalizzare la mia tesi su questo argomento. La ricerca scientifica sta facendo passi da gigante a riguardo: molto probabilmente un domani le allergie alimentari avranno un rimedio.

Il microbiota intestinale ha acquisito sempre più valore nell’approccio della cura di varie patologie, anche per quanto riguarda le allergie alimentari; prove emergenti associano le allergie a cambiamenti compositivi e funzionali del nostro microbiota intestinale e non da meno molti studi sperimentano l’utilizzo di vari probiotici destinati al trattamento o alla prevenzione delle allergie. Inoltre, l’utilizzo di probiotici può essere una grande opportunità da tenere in considerazione, la motivazione? Proviamo a pensare se si potesse curare veramente ogni patologia solo con essi, sarebbe una svolta! Per ora sembra incredibile, ma nulla è impossibile! Anche il mondo vegetale desta un particolare interesse nel cercare di ripristinare le condizioni di ipersensibilità alimentare, sebbene si tratti di una ricerca ancora in via di sviluppo, è incoraggiata da ottimi risultati ottenuti finora, e ben presto starà alla base di un’eventuale applicazione futura.

1. Il microbiota intestinale

Il corpo umano ospita nel tratto enterico un'ampia comunità di microrganismi benefici, “non patogeni”, in sinergia con il totale apparato digestivo, noto come “microbiota intestinale”.

Si ritiene che questi ultimi siano pari o addirittura maggiori in numero rispetto alle cellule costituenti il singolo corpo umano e possano appartenere a uno dei tre domini della vita, *Archaea*, *Bacteria* ed *Eukarya*, includendo anche virus.

Essi vivono in equilibrio tra loro e questa condizione viene definita “eubiosi” alla quale si dà un'importanza rilevante, perché sta alla base di una buona funzionalità e sincronizzazione sia tra loro, sia tra l'ecosistema intestinale. In tal stato il microbiota è in grado di svolgere una serie di funzioni essenziali per l'ospite, concorrendo alla salute generale dell'essere umano.

Al contrario un'alterazione in numero e qualità delle specie microbiche dovuta a varie cause e fattori, condizione di “disbiosi”, comporterebbe di riflesso il cessare delle funzionalità intestinali, ma non solo, e di conseguenza all'insorgere di molteplici patologie.

Nei prossimi sotto capitoli si cerca di esporre in modo dettagliato la composizione del microbiota intestinale e ciò che può variarla, le funzioni che instaura con il nostro organismo e le conoscenze che abbiamo a riguardo, le quali stanno alla base degli studi che andranno ad essere esemplificativi dell'utilizzo di probiotici per il possibile ripristino delle allergie alimentari.

1.1 Evoluzione del microbiota nel corso della vita dell'individuo

Durante tutte le fasi del ciclo vitale di ogni individuo viene ad essere costituito il proprio microbiota intestinale. Ogni soggetto presenta una propria impronta digitale batterica, differente da quella di tutti gli altri individui, ma allo stesso tempo all'interno di questa comunità sono rappresentate delle specie note in tutta la popolazione provenienti da quattro phyla dominanti, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*.

L'abbondanza e la qualità delle specie facenti parte delle categorie elencate precedentemente si distribuiscono in modo diverso a partire dallo stomaco e aumentando gradualmente fino al colon (sezione longitudinale). Il tratto finale dell'intestino è caratterizzato da una maggiore carica batterica, zona più ricca di nutrienti indigeribili per l'essere umano e povera di ossigeno, infatti ritroviamo anaerobi come *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium*. (Figura 1).

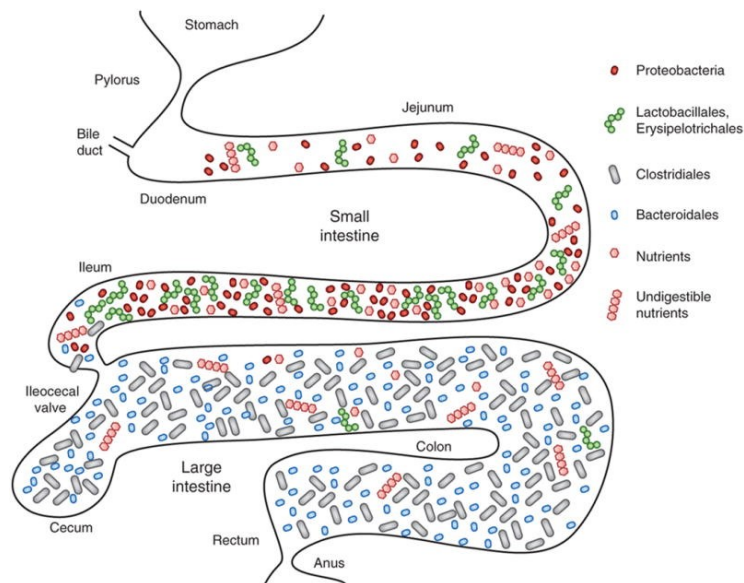


Figura 1. “Distribuzione del microbiota nel tratto intestinale.” ⁽¹⁾

In modo più preciso lo studio di Miller, *et al.* (2021) ⁽²⁾ approfondisce l’eterogeneità (carica microbica e tipologie di specie batteriche) del microbiota sia nella sezione longitudinale dell’intestino (dal tenue al crasso) sia quella trasversale, suddivisa quest’ultima in tre strati principali, ovvero, a partire dall’interno, si presenta il lumen e verso l’esterno rispettivamente la mucosa interna ed esterna.

“Longitudinal heterogeneity in the composition of the intestinal microbiota is explained by dietary and host factors that control the availability of electron donors and electron acceptors, thereby selecting for different strategies in microbial energy metabolism that can succeed in each habitat patch. In contrast, the longitudinal heterogeneity in the density of the intestinal microbiota is generated by antimicrobial host functions that limit the size of microbial communities in the small intestine.” ⁽²⁾

Per quanto riguarda la sezione intestinale in lunghezza, lo studio pone attenzione sulle differenze in numero e qualità delle specie microbiche presenti tra il tenue e il crasso.

La prima parte dell’intestino (small intestine) è caratterizzata dalla presenza di ossigeno derivante dalla circolazione sanguigna utile ad ossidare zuccheri, acidi grassi e amminoacidi degradati dagli enzimi digestivi; in seguito, nell’area corrispondente all’ileo, le cellule epiteliali sintetizzano enzimi che generano nitrato (NO_3^-). In questo modo, per la presenza di ossigeno e NO_3^- , la porzione del tenue si popola di specie batteriche definite anaerobi facoltativi, ovvero microrganismi per i quali l’ossigeno non è indispensabile, ma in sua presenza viene comunque impiegato per trarre energia attraverso la respirazione aerobica. Inoltre, sempre nel tenue, si evidenzia una carica microbica minoritaria rispetto alla parte distale dell’intestino; questo è dovuto al fatto che la presenza dei batteri è limitata dalla secrezione acida dello stomaco, dalla peristalsi che velocizza il passaggio del contenuto riducendo il tempo per la replicazione e in fine anche dalle immunoglobuline e proteine antimicrobiche presenti all’interno del succo pancreatico secreto a livello duodenale.

Al contrario più ci si sposta verso la porzione finale (colon) più aumenta la densità microbica, questo perché si riducono di molto i fattori elencati sopra, ci si allontana sempre di più dall'ambiente acido gastrico, la motilità è più lenta e perciò favorisce la proliferazione batterica, non sono presenti molecole antimicrobiche del pancreas, mentre si sviluppa una risposta immunitaria anticorpale.

Per quanto riguarda le tipologie di specie presenti nel crasso si evidenziano anaerobi obbligati, i quali non necessitano di O₂, anzi l'eventuale sua presenza ne inibisce la crescita. Questo è in linea con la fisiologia intestinale, perché la sua parte finale rispecchia una zona di ipossia e quindi la presenza di questi ultimi batteri che trarranno energia con la fermentazione (utile a degradare molecole indigeribili dall'organismo umano) piuttosto che con la respirazione aerobica, come invece avviene nel tratto iniziale.

Relativamente alla sezione trasversale, lo studio di Miller si sofferma a caratterizzare ancora una volta l'abbondanza differente della comunità microbica e il tipo di batteri che ne fanno parte, ma in questo caso dal lumen alla mucosa esterna.

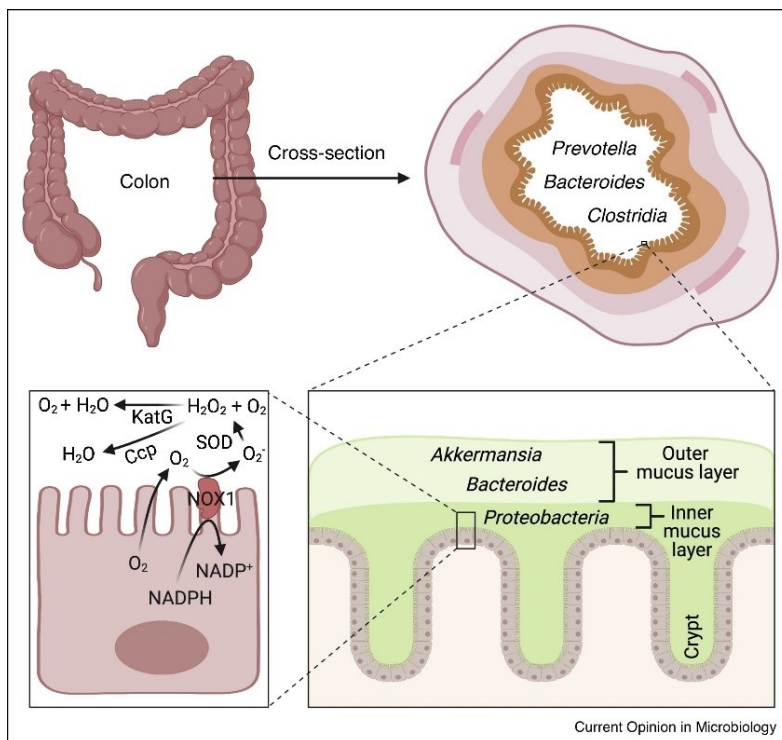


Figura 2. “The host structures the cross-sectional heterogeneity in the colonic microbiota composition and density using mucus and the epithelial NADPH oxidase NOX1. The lumen of the colon is enriched in fiber-eaters (Prevotella, Bacteroides, and Clostridia). At the mucosal surface, the host maintains a loose outer mucus layer that is densely colonized by mucus eaters (Akkermansia and Bacteroides) and a dense inner mucus layer that exhibits a markedly reduced bacterial density. NOX1 is constitutively synthesized in the colonic epithelium and generates superoxide radicals (O₂⁻) that help to separate the microbiota from the epithelial layer. Proteobacteria can use superoxide dismutase (SOD), catalase (KatG) and cytochrome c peroxidase (Ccp) to grow in the inner mucus layer.”⁽²⁾

Come riportato nella figura 2, il lume intestinale è la zona più ricca di batteri, caratterizzata principalmente dal genere *Prevotella*, *Bacteroides* e *Clostridia*, ovvero i cosiddetti “mangiatori di fibre”. Proseguendo verso l'esterno si trova la mucosa interna, la quale è rappresentata da una carica batterica ridotta rispetto le altre zone trasversali.

Questa minoranza è data dal fatto che le cellule facenti parte di questo strato centrale producono muco molto compatto che agisce come barriera fisica e hanno la presenza di NADPH-ossidasi (NOX1) che genera radicali superossido (O_2^-) con azione antimicrobica. Tuttavia quest'area è rappresentata da *Proteobacteria*, phylum in grado di proteggersi dai danni ossidativi di O_2^- impiegando l'enzima superossido dismutasi (SOD), catalasi e citocromo c perossidasi. In seguito la mucosa esterna, diversamente da quella sottostante, produce un muco più fluido maggiormente accessibile, in questo caso si trovano batteri appartenenti a gruppi come *Akkermansia* e *Bacteroides*, ovvero i “mangiatori di muco”. Molto spesso nutrirsi di muco può essere un vantaggio nelle circostanze in cui venga a mancare la fibra, riuscendo così a sopravvivere passando al catabolismo dei mucinoglicani. In generale quindi possiamo ritenere che a livello trasversale l'intestino cerchi di mettere in atto tutta una serie di filtri (muco compatto, ROS e presenza di glicani-mucina) che inducano la riduzione della densità microbica nello strato mucoso interno, proteggendo così l'epitelio, e viceversa un arricchimento verso il lumen. ⁽²⁾

È importante sottolineare che la composizione del microbiota intestinale non rimane sempre invariata, può mutare oltre che nel corso della vita, addirittura nel corso della giornata, questo perché dipende molto da diversi fattori, in base agli alimenti che ingeriamo (dieta), all'eventuale utilizzo di alcuni farmaci o meglio ancora antibiotici, allo stile di vita e abitudini. Inoltre possiamo evidenziare una netta differenza nel microbiota di un neonato, un adulto sano e un individuo anziano. Il microbiota cambia a seguito del patrimonio genetico, del luogo in cui si vive, il tipo di parto (naturale o cesareo) e di allattamento ricevuto.

È difficile perciò dettare quello che viene ad essere definito “microbiota sano”, non esiste un microbiota che possa andare bene per tutti, ma allo stesso tempo cresce sempre più la consapevolezza che una certa composizione (presenza di alcune specie piuttosto che altre, abbondanza piuttosto che carenza) possa variare lo stato di salute dell'essere umano. Questo ha accresciuto l'interesse ad evidenziare i ceppi che vanno a caratterizzarlo maggiormente e che assumono un aspetto positivo e, soprattutto, ha alimentato lo sviluppo di strategie per influenzarlo.

I seguenti sotto capitoli trattano la composizione del microbiota funzionale allo stadio di vita dell'essere umano, dal periodo di gravidanza alla nascita, per concentrarsi poi nei primi anni di vita fino ad arrivare all'adulto, sottolineando tutti quelli che possono essere i fattori che determinano la sua costituzione.

1.1.1 Composizione del microbiota nelle prime fasi di vita: gravidanza, parto, allattamento e svezzamento

Fino ai due anni di vita si crea la base del microbiota che sarà poi fondamentale nella determinazione dell'equilibrio di quello maturo (adulto). Possiamo da ciò comprendere che l'infanzia sia essenziale per una buona composizione o meno della comunità microbica intestinale, ovvero sia responsabile di salute o malattia nell'età precoce, ma anche nel futuro. Dallo studio di Cristian Milani ⁽³⁾, *et al.* infatti si rivela:

“Alterations and aberrations in the gut microbiota composition during neonatal life, which represents the first month of life from the moment of birth, as well as during infancy, which spans 1 month until 2 years of age, have been associated with pediatric disorders and the onset of disease in later life. We may assume that the early gut microbiota contributes to disease progression later in life and that the foundation for a stable adult gut microbiota is already established in infancy.” ⁽³⁾

Fino a poco tempo fa si pensava che il periodo di gravidanza non incidesse nella colonizzazione microbica del feto, in quanto la placenta si credeva essere sterile. Studi recenti invece, dimostrano la presenza di un microbioma specifico nel tratto placentare e nel meconio fetale, che suggerisce ci sia un primo stadio di colonizzazione intestinale neonatale già in fase intrauterina. ⁽³⁾

Lo studio di Aagaard K, *et al.* ⁽⁴⁾ descrive in prima parte la tipologia di specie che vanno ad instaurarsi nella placenta e successivamente si sofferma sulla differenziazione della composizione nel caso di parto prematuro (<37 settimane) e di infezione antepartum della madre. Considerando che da soggetto a soggetto ci sia disuguaglianza di specie batteriche, d'altra parte si può evidenziare una abbondanza nella placenta di *E. coli* nella maggioranza dei campioni analizzati. Inoltre inaspettatamente si ritrovano phyla facenti parte del microbioma orale, così da evidenziare una netta somiglianza tra le due zone così diverse e distanti tra loro, ma vicine in termini di composizione microbica.

Per esempio *Prevotella tanneriae* (fessure gengivali), *Neisseria* non patogene (superfici mucose) sono comunemente descritti tra le madri prese in oggetto dallo studio. Al contrario le aree anatomiche più adiacenti, vagina e feci, non collaborano nella composizione del microbiota placentare in quanto non ricavabile alcuna somiglianza. (Figura 3)

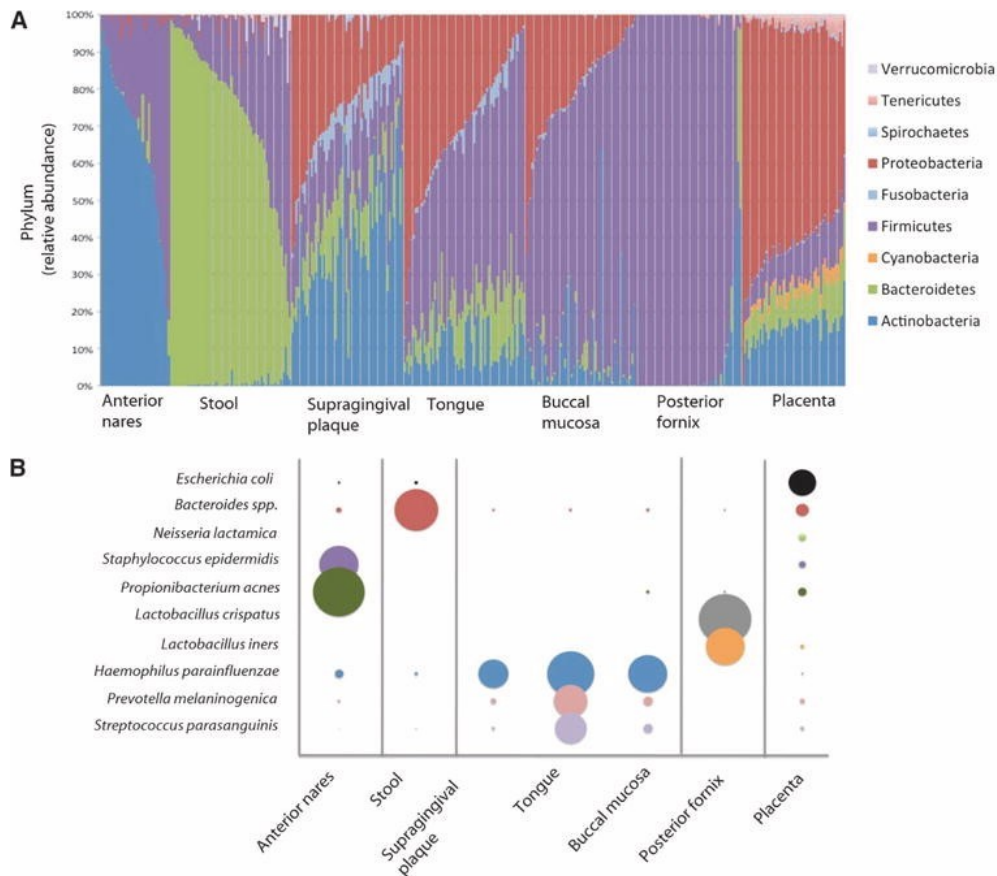


Figura 3. “(A) L’abbondanza a livello di phylum (asse y) è rappresentata da barre verticali che indicano il phylum dominante per ciascuno dei sette siti del corpo, dove ogni barra indica un soggetto indipendente raggruppato per nicchia del sito del corpo. L’abbondanza a livello di phylum per taxa specifici è relativamente stabile tra tutti i campioni placentari rispetto a quella dei siti orali. (B) Il grafico a bolle mostra la prevalenza e l’abbondanza relativa di specie rappresentative in ogni sito del corpo, proiettato come composito in scala.”⁽⁴⁾

Ulteriormente lo studio ha evidenziato che il microbioma placentare è significativamente associato alla settimana del periodo di gravidanza, infatti nel caso di parto pretermine si identificano taxa placentari con una abbondanza differente. In particolare nei campioni placentari pretermine si individua una preponderanza, per esempio, del genere *Burkholderia* e al contrario *Paenibacillus* caratterizza l’arricchimento di quelli a termine. Inoltre *Actinomycetales* (*Rhodococcus*) e *Alphaproteobacteria* (*Roseovarius*) distingue sempre l’abbondanza nella placenta pretermine. (Figura 4)

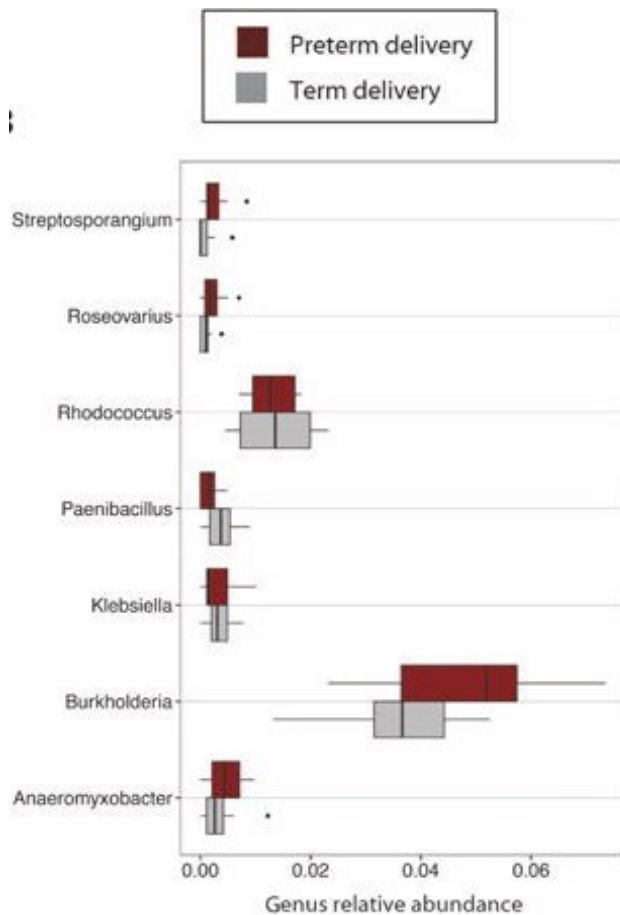


Figura 4. “Taxa batterici derivati dai dati di sequenza WGS identificati come differenzialmente abbondanti tra i campioni placentari dalla nascita pretermine rispetto alle gestazioni a termine.”⁽⁴⁾

Lo stesso studio ha definito anche diversi percorsi metabolici in cui le varie specie sono coinvolte, notando un aumento nel metabolismo del metano, nella biosintesi degli alcaloidi isochinolina e nel metabolismo di glicina/serina/treonina e riduzione del metabolismo della biotina e delle vie di ancoraggio del glicosilfosfatidilinositolo.

L’ultima parte dello studio dedica invece la caratterizzazione dei campioni placentari di madri che hanno subito un’infezione da *Streptococco* durante la gravidanza. Si evince che la comunità microbica placentare in quest’ultimo caso si distingue da quella di donne gravide che hanno partorito pretermine, avendo un’abbondanza di *Streptococcus* e *Acinetobacter*. Più precisamente si nota nella (Figura 5) la netta differenza di taxa microbici tra campioni pretermine e campioni con infezione antepartum.

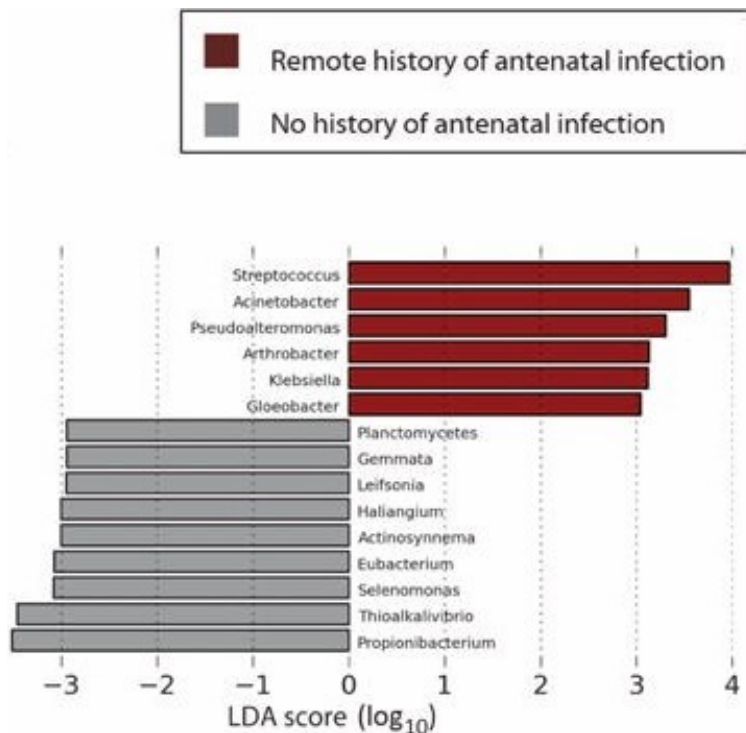


Figura 5. “I taxa batterici derivati da WGS sono stati identificati come differentemente abbondanti tra gravidae con e senza una storia di infezione prenatale remota.”⁽⁴⁾

È importante precisare che non si riesce a distinguere se sia stata la remota infezione prenatale o la sua terapia antibiotica clinicamente prescritta ad avere un effetto sulla comunità del microbiota placentare.⁽⁴⁾

Successivamente il momento della nascita gioca un grosso ruolo nella colonizzazione massiva del microbiota intestinale del nascituro; attraverso il passaggio del canale del parto il neonato viene a contatto con molteplici specie microbiche che derivano infatti dal microbiota vaginale materno, da quello fecale materno e non solo, anche il personale ospedaliero che lo manipola, madre, padre e il luogo del parto vengono ad essere da tramite dell’arricchimento di specie derivanti principalmente da microbiota orale e cutaneo di quest’ultime, generando una variata comunità microbica del neonato.

Lo studio di Milani⁽³⁾ (2017) descrive quindi la tipica composizione del microbiota intestinale di bambini nati con parto naturale che presentano soprattutto *Lactobacillus* e *Prevotella*, associati ai batteri vaginali. Inoltre il medesimo studio va a precisare anche la diversa colonizzazione batterica per bambini nati con parto cesareo, è dettata dal fatto che questi saranno più soggetti all’incontro di microbi ospedalieri, piuttosto che da microorganismi materni. Infatti mentre quelli nati da parto naturale presentano prevalentemente batteri vaginali, quelli venuti al mondo con parto cesareo sono colonizzati per lo più da batteri epidermici materni e del personale ospedaliero come *Proteobatteri* e *Firmicutes* (*Clostridium*, *Staphylococcus*) nei primi giorni di vita e *Actinobatteri* (*Corynebacterium*), dopo circa una settimana, si ritrovano nelle feci. Oltretutto si precisa il fatto che il microbiota intestinale di soggetti nati con taglio cesareo mostra anche una ridotta complessità, soprattutto per quanto riguarda la minor rappresentanza di microrganismi come *Bifidobacterium* e *Bacteroides*. È

importante puntualizzare che queste differenze compositive tra nati con parto naturale e cesareo persistano fino all'età di almeno 7 anni e abbiano implicazioni sulla salute a lungo termine. A riguardo lo studio riporta che il livello di chemochine associate a Th1 siano notevolmente ridotte in soggetti nati con taglio cesareo e ciò è associato a una maggiore probabilità dell'insorgere di malattie allergiche, ciò significa che la composizione del microbiota intestinale instaurato in età precoce detta anche la maturazione e lo sviluppo del sistema immunitario dell'ospite.

Altro fenomeno che condiziona la costituzione precoce del microbiota intestinale del bambino è il tipo di alimentazione. Anche per questo fattore lo studio ⁽³⁾ esprime la notevole differenza nella composizione del microbiota infantile tra neonati allattati al seno e quelli alimentati con formula.

Il latte materno fornisce insieme ai suoi nutrienti una serie di sostanze che promuovono la proliferazione di alcuni batteri benefici e allo stesso tempo anche sostanze antimicrobiche, contro microrganismi potenzialmente patogeni. Apporta inoltre IgA (immunoglobuline A) che donano al neonato una prima immunità passiva, per questo il sistema immunitario di lattanti nutriti direttamente dal seno viene definito maggiormente "tollerogenico". Si definiscono in fine elevati livelli di *Bifidobatteri* e *Lattobacilli* nei bambini allattati al seno, mentre per coloro che sono stati alimentati con latte artificiale dominano *Stafilococchi*, *Bacteroides*, *Clostridi*, *Enterococchi*, *Enterobatteri* e il genere *Atopobium*. La conseguenza della divergenza tra queste due differenti composizioni si riflette sempre su una maggiore vulnerabilità, per il secondo gruppo, che può dare ripercussioni anche nella vita adulta.

Successivamente lo svezzamento, ovvero l'inserimento di cibi solidi diversi dal latte (materno o formula), scatena una modulazione della composizione del microbiota neonatale, avvicinandosi sempre di più a quella dell'adulto. In questa fase il profilo della comunità microbica evidenzia principalmente la sostituzione di *Proteobacteria* e *Actinobacteria* con *Firmicutes* e *Bacteroidetes*.

Inoltre vengono ad aumentare relativamente alcune famiglie batteriche, tra cui *Lachnospiraceae* (associata all'aumento di assunzione di proteine), *Ruminococcaceae*, *Eubacteriaceae*, *Rikenellaceae*; al contrario vengono a diminuire le famiglie di *Bifidobacteriaceae* (associata al latte materno), *Actinomycetaceae*, *Veillonellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae* e *Fusobacteriaceae*.

La diversità batterica osservata è legata ovviamente all'introito di cibi variegati e solidi, diversi dal "semplice" e unico latte. Questo implica il cambiamento di aspetti funzionali diversi, connessi alla sinergia tra microrganismi ed essere umano, ovvero un microbiota coinvolto nella degradazione di polisaccaridi vegetali, xenobiotici e per di più interessato nella biosintesi di vitamine. Inoltre induce livelli totali di SCFA (short chain fatty acid) aumentati in modo consistente, soprattutto per quanto riguarda il butirrato. ⁽³⁾

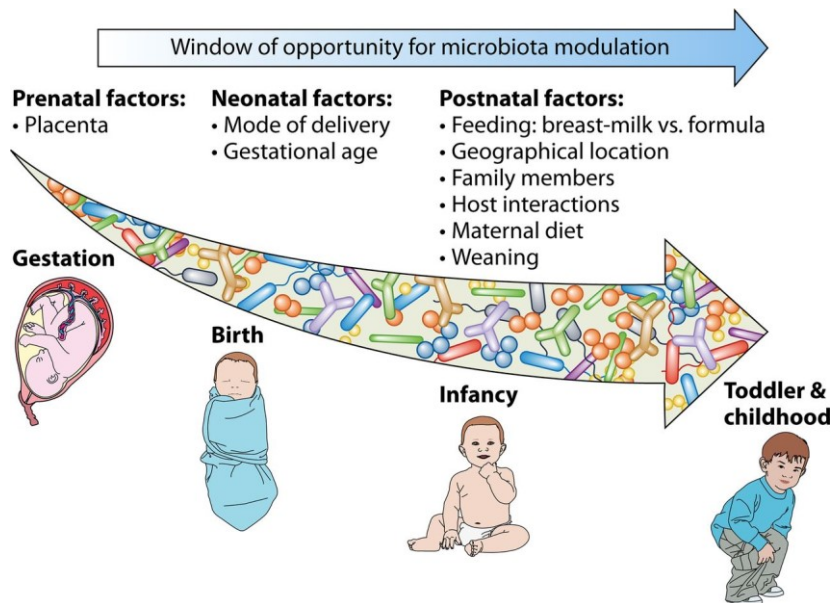


Figura 6. “Finestra di opportunità per la modulazione del microbiota dalla gestazione all’infanzia. La rappresentazione schematica mostra un elenco di fattori prenatali, neonatali e postnatali che contribuiscono alla composizione batterica intestinale nei neonati.” ⁽³⁾

1.1.2 Composizione del microbiota intestinale nell’adulto

Già alla fine del secondo anno di vita, il microbiota intestinale di ogni soggetto sano comincia a prendere sempre più somiglianza a quello adulto.

Il libro “Dermobiotica” di Marco Pignatti (2018) ⁽⁵⁾ dà una chiara idea sulle categorie di microrganismi che contraddistinguono il microbiota intestinale “maturo” con una preponderanza di *Firmicutes* (circa il 60%), un 10% di *Bacteroidetes*, un altro 10% di *Actinobacteria*, una presenza significativa di *Verrucomicrobia* e infine un’entità minore di *Proteobacteria* che comprendono le *Enterobacteriaceae* come *Escherichia*, *Klebsiella* e *Shigella*.

La Tabella 1 sottostante (ricavata sempre dallo stesso testo) raccoglie i principali componenti del microbiota umano suddivise per phyla, classe, famiglia e genere. ⁽⁵⁾

Tabella 1. “Batteri principali componenti il microbiota intestinale adulto suddivisi per phyla, classe, famiglia e genere” ⁽⁵⁾

Componenti del microbiota umano.					
Phylum	Classe	Famiglia	Genere		
Firmicutes	Clostridia	Lachnospiraceae (35%)	<i>Butyrivibrio, Catonella, Coprococcus, Johnsonella, Lachnobacterium, Lachnospira, Oribacterium, Pseudobutyrvibrio, Roseburia, Shuttleworthia, Sporobacterium</i>		
		Ruminococcaceae (20%)	<i>Faecalibacterium, Ruminococcus</i>		
		Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>		
		Peptostreptococcaceae			
		Peptococcaceae			
		Eubacteriaceae	<i>Acesobacterium, Eubacterium</i>		
		Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>		
		Negativicutes	Veillonellaceae (5%)	<i>Colibacter, Veillonella</i>	
		Erysipelotrichia	Erysipelotrichaceae (3%)	<i>Coprobacillus, Erysipelotrix</i>	
		Bacilli	Streptococcaceae	<i>Streptococcus, Lactococcus</i>	
				Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>
				Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus spp</i>
				Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>
				Leuconostocaceae	
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>				
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidaceae (10%)	<i>Bacteroides spp</i>		
		Rikenellaceae			
		Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i>		
		Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>		
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Bifidobacteriaceae</i> (10%)	<i>Bifidobacterium spp</i>		
		Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>		
		Coriobacteria	Coriobacteriaceae (4%)		
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiaceae			
		Akkermansiaceae	<i>Akkermansia</i>		
Proteobacteria	α -proteobacteria	Acetobacteraceae	<i>Acetobacter</i>		
		Oxalobacteraceae			
		Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Salmonella, Shigella</i>		
		Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>		

Nell’anziano si verifica un declino di tutte le funzionalità dell’organismo umano, anche il tratto gastrointestinale è parte di questo deterioramento che si precisa essere più o meno severo da soggetto a soggetto. Si assiste inoltre a una progressiva degenerazione del sistema nervoso enterico, la motilità intestinale può venire meno, inducendo complicazioni nel processo digestivo e molto spesso si riscontra una barriera intestinale alterata con la relativa riduzione delle funzioni di difesa. Tutto ciò comporta di conseguenza stati patologici all’apparato digerente associati a loro volta ad un cambiamento del normale microbiota intestinale. Infatti l’anziano presenta una composizione della comunità microbica differente da quella di un adulto sano.

Uno studio di F. Mangiola *et al.* ⁽⁶⁾ condotto in Italia ha comparato 21 soggetti di anni 99-104, 22 dai 63 ai 76 anni, 20 di 25-40 e infine 21 figli di centenari di età compresa tra i 59 e 78 anni. Si è dimostrato che la diversità batterica con il processo dell’invecchiamento diminuisce, più precisamente il microbiota di persone estremamente anziane è dominato ancora da *Bacteroides* e *Firmicutes*, ma la proporzione relativa alle sottoclassi dei *Firmicutes* cambia: il cluster di

Clostridium XIVa è diminuito, mentre i *Bacilli* aumentano e si ha un riarrangiamento del cluster *Clostridium IV*.

Per di più nel microbiota intestinale di centenari si rileva un alto quantitativo di *Proteobacteria*, un phylum che include molti batteri potenzialmente patogeni, mentre diversi produttori di butirrato sono stati osservati in concentrazioni inferiori (*Ruminococcus obeum*, *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium ventriosum*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii*, tutti appartenenti a *Clostridium* cluster *XIVa*, *Papillibacter cinnamovorans* e *Faecalibacterium prausnitzii* del *Clostridium* cluster *IV*). Si sottolinea il fatto che *Faecalibacterium prausnitzii* è una specie protettiva contro l'infiammazione intestinale.

La vita longeva di questi soggetti al contrario è spiegata dall'aumento di *Anaerotruncus colihominis* (*Clostridium* cluster *IV*) ed *Eubacterium limosum* (*Clostridium* cluster *XV*) in grado di produrre elevate quantità di SCFA (butirrato). Una diminuzione dei *Bifidobatteri* e un aumento dei livelli di *Akkermansia muciniphila*, che degrada la mucina, sono stati rilevati anche nelle persone anziane rispetto ai giovani adulti. ⁽⁶⁾

1.2 Funzioni del microbiota intestinale

Il microbiota intestinale è fondamentale per molte funzioni vitali dell'essere umano; è responsabile del metabolismo (trasformazione) del cibo che ingeriamo, senza la presenza di questi microrganismi non saremo in grado di digerire varie molecole. Questa comunità batterica infatti presenta un corredo enzimatico diverso da quello delle cellule dell'apparato intestinale, ciò fa sì che questi ultimi siano in grado di ottenere energia dalle fonti indigeribili per il corpo umano e nel contempo permettono un buon processo di digestione. Si tratta per esempio di particolari carboidrati complessi come il cosiddetto "amido resistente" e la più comunemente chiamata "fibra", ovvero una miscela estremamente complessa di polisaccaridi diversi come cellulosa, emicellulose, pectine, mucillagini, gomme, galattomannani, betaglucani e lignina.

Da queste fonti sopra elencate alcuni batteri producono gli SCFAs (Short Chain Fatty Acids), ovvero gli acidi grassi a corta catena (butirrato, propionato e acetato) che hanno effetti positivi sulla salute umana. Il butirrato è una delle principali fonti energetiche per i colonociti (cellule del colon), quindi concorre a non generare atrofia della mucosa e aumentare la funzione di barriera intestinale. Inoltre uno studio di Furusawa Y *et al.* (2013) ⁽⁷⁾, dimostra che il butirrato potrebbe essere un fattore di induzione delle cellule T regolatorie del colon che hanno un ruolo centrale nella soppressione delle risposte infiammatorie e allergiche. ⁽⁷⁾ Gli SCFAs in generale hanno azione anti-infiammatoria, anti-lipogenica, migliorano la sensibilità all'insulina, aumentano il consumo energetico e il senso di sazietà, proteggendo in questo modo da obesità, diabete e altre malattie correlate.

La comunità microbica è parte della biosintesi di vitamine come la K2 (per l'assorbimento di calcio e l'omeostasi del tessuto osseo), cobalamina, niacina, riboflavina, biotina, acido pantotenico e piridossina.

Il microbiota è poi essenziale nel mantenimento e nella regolazione del sistema immunitario, il giusto equilibrio di batteri regola l'acidità del sistema digerente (abbassamento del pH) che evita la proliferazione di eventuali microrganismi in grado di dare malattia, produce batteriocine

e sostanze antibiotiche che vanno sempre ad avere un ruolo di difesa contro agenti patogeni, acquisendo così una maggior tolleranza immunologica e un sistema immunitario forte. Inoltre, il microbioma intestinale contribuisce anche nel riciclo degli acidi biliari (acido desossicolico, acido litocolico), nel metabolismo dei polifenoli, antiossidanti e ammine. È parte integrante dell'eliminazione e detossificazione di tossine dal lume intestinale ed è compreso nel metabolismo (attivazione/eliminazione) di alcuni farmaci. Al contrario la disbiosi sembra essere tra le cause di infezioni, allergie e malattie autoimmuni.

Infine per dare ancora maggior importanza a questo vero e proprio organo di microrganismi a livello intestinale è stato rilevato esserci una stretta connessione con il sistema nervoso centrale (SNC); questa relazione è data dalla condivisione degli stessi trasmettitori e fa sì che il nostro microbiota possa condizionare il nostro comportamento e la disbiosi, sotto questo punto di vista, sembra poter essere annoverata tra le cause di neurodegenerazione, psicosi e depressione.

1.3 Fattori di disbiosi

Si definisce disbiosi lo sbilanciamento, sia in termini quantitativi sia qualitativi, della comunità microbica intestinale che incide negativamente sulla funzione metabolica e che, come spesso è stato riferito nelle pagine precedenti, comporta una riduzione dello stato di salute.

Tutto ciò che verrà riportato successivamente è fonte del libro “Dermobiotica” (2018) ⁽⁵⁾.

La disbiosi intestinale si può manifestare in diversi modi, il primo riguarda la “disbiosi carenziale”, ovvero un deficit di specie batteriche, soprattutto *Bifidobatteri* e *Lattobacilli*, dovuto molto probabilmente ad una dieta povera di fibre e ricca di alimenti ultraprocessati, oppure conseguente ad un largo uso di antibiotici. Il secondo caso concerne la “disbiosi putrefattiva”, associata all'apporto eccessivo di grassi animali e carni e minoritario di fibra (aumento di *Batterioidi*, *Clostridi*, *Peptococchi* ed *Eubatteri*); la “disbiosi da sensibilizzazione” invece si verifica a causa di una risposta immunitaria a componenti della comunità batterica intestinale fisiologica, comportando un'inflammatione dell'apparato digestivo.

Infine l'ultima tipologia di mancanza di equilibrio che si può instaurare è la “disbiosi da funghi” nella quale si ha una crescita eccessiva di saccaromiceti (funghi) o *Candida*, collegata a una dieta ricca in zuccheri semplici, alimenti lievitati, carboidrati raffinati e povera in fibre.

Come già anticipato, il modo di alimentarsi di un individuo gioca un grosso ruolo nel mantenere un buon equilibrio della comunità microbica (eubiosi) e viceversa può essere anche una delle prime cause di disbiosi. Le fibre, indigeribili dall'organismo umano, sono la principale fonte energetica per i batteri commensali (prebiotico), è chiaro quindi, che una loro mancanza possa favorire la non proliferazione di questi ultimi, causando un aspetto carenziale del profilo microbico.

Anche diete poco variate e la sovrabbondanza dei pasti, soprattutto la sera, non vanno di pari passo con una buona funzionalità intestinale e di conseguenza neanche con il suo microbiota. Cibarsi di alimenti variati significa apportare tutti i macro e micro-nutrienti, questa eterogeneità promuove sicuramente l'aumento della diversificazione microbica, concetto essenziale per un buon equilibrio e stato di salute. Un altro problema di rilievo è l'introduzione di alimenti poco

genuini, ovvero quelli che hanno subito processi di raffinazione, sterilizzazione ad alte temperature e altri trattamenti di questo tipo che non contribuiscono certamente alla crescita del patrimonio di commensali probiotici.

Gli studi riportati sempre dal libro *Dermobiotica* ⁽⁵⁾ mettono in risalto l'associazione dei vari macro-nutrienti (carboidrati, proteine e lipidi) con i cambiamenti del microbiota intestinale.

Per quanto riguarda la categoria dei glucidi si sottolinea il fatto che un apporto alimentare ricco di zuccheri raffinati porti ad un incremento di batteri opportunisti, come *C. difficile* e il *C. perfringens*; viceversa i carboidrati complessi la diminuiscono. Inoltre è stato riportato da studi clinici che l'inulina e i FOS (frutto-oligosaccaridi), entrambe carboidrati non digeribili, favoriscano la crescita di "microrganismi sani" come *Bifidobacterium* e in alcuni casi anche *Lactobacillus*, mentre un'integrazione di fruttani riduce i *Bacteroides* e *Clostridium* e nel frattempo promuove la produzione batterica di butirrato.

In merito all'altra grande classe di macro-molecole, le proteine, il libro si sofferma nel discutere che un loro eccesso conduca all'elaborazione di metaboliti batterici molto spesso dannosi per l'essere umano. A livello del colon si ha una fermentazione delle proteine non del tutto digerite con la successiva produzione sia di acidi grassi a corta catena e acidi grassi ramificati sia di metaboliti poco salutari, ovvero ammoniaci (in grado di alterare le cellule intestinali e aumentare la probabilità di crescita neoplastica o essere indice di encefalopatia porto-sistemica), ammine, indoli, fenoli (implicati nell'insorgenza dell'emicrania) e solfiti. Questi effetti nocivi potrebbero essere risolti abbassando il pH intestinale con l'assunzione regolare di fibre e amido resistente.

Per quanto riguarda i lipidi invece l'autore Marco Pignatti ⁽⁵⁾ ha approfondito il ruolo degli acidi grassi polinsaturi; omega-3 e omega-6 sono considerati essenziali, ma sembra esserci un potenziale effetto dannoso sul microbiota nel momento in cui vengono assunti omega-6 in eccesso e non in rapporto ottimale con gli omega-3 ($\Omega 6:\Omega 3 = 4:1$). Di fatto l'abbondanza di acido linoleico ($\Omega 6$) è accompagnata con la promozione di *Enterobacteriaceae*, associate a IBD (malattie infiammatorie intestinali) e dei *Clostridia*, al contrario l'integrazione di omega-3 ribalta gli effetti arricchendo oltretutto la comunità batterica di *Bifidobacteria spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Enterococcus faecium*. ⁽⁵⁾

Un altro fattore oltre l'ambito alimentare che gioca un grosso ruolo nel cambiamento della composizione del microbiota intestinale e quindi anche di una probabile insorgenza di disbiosi riguarda lo stile di vita.

Ancora una volta il testo *Dermobiotica* ⁽⁵⁾ riferisce uno studio di confronto del microbiota di donne attive (almeno 10 ore settimanali di attività) e donne sedentarie, riportando dati molto evidenti: un incremento di specie batteriche positive per la salute umana nelle donne che svolgono esercizio fisico, tra cui *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia hominis* e *Akkermansia muciniphila*. ⁽⁵⁾

Anche l'igiene eccessiva è ormai da tempo risaputa che possa ridurre l'opportunità di colonizzazione batterica, dando da un lato una minor probabilità di riscontrare malattie infettive, ma dall'altro accrescere uno stato di carenza del microbiota, collegato successivamente all'incidenza di malattie allergiche ed autoimmuni. Ciò si verifica soprattutto nel caso in cui l'eccesso di igiene si determini nei primi anni di vita del bambino, il quale ha

bisogno di un'esposizione microbica continua per sviluppare una comunità batterica adeguata.⁽⁵⁾

Come è già stato anticipato, un largo uso di antibiotici porta alla selezione di microrganismi sempre più resistenti, non vengono eliminati solo batteri patogeni ma anche quelli benefici sconvolgendo così l'eubiosi e permettendo a quelli resistenti di prendere il sopravvento. È utile quindi assumere antibiotici solo se opportuno e strettamente su consiglio medico. Anche molte categorie di farmaci si sono viste essere causa di alterazione microbica, gli antiacidi PPI (Inibitori di Pompa Protonica), vengono usati molto spesso come gastroprotettori e per la cura di sintomi patologici che possono essere indotti da *Helicobacter Pylori*, come gastrite, ulcera peptica e reflusso gastroesofageo. Questi medicinali favoriscono la SIBO (small intestinal bacterial overgrowth), ovvero l'ipocloridria causata dai PPI fa sì che i batteri introdotti con gli alimenti non vengano eliminati grazie al pH acido dello stomaco e ciò comporta un aumento di specie potenzialmente patogene nel tenue, tratto intestinale rappresentato in condizioni fisiologiche da una minor carica batterica rispetto al colon. Di conseguenza si nota un'incidenza di infezioni enteriche associate soprattutto a *Clostridium difficile*, *Salmonella* e *Campylobacter*. Altro parametro che si evidenzia è il fatto che vengano ad essere presenti in modo numeroso specie tipiche della mucosa orale come *Rothia dentocariosa*, *Rothia mucillaginoso*, il genere *Scardovia*, *Actinomiceti* e *Micrococcaceae*.

Altra classe di farmaci utilizzata in caso di stipsi, i lassativi, vengono a rappresentare probabili stati carenziali delle specie transitorie del microbiota, perciò microrganismi che hanno una grossa capacità di aderire alla mucosa intestinale rimangono quasi inalterati, mentre i restanti sono trascinati via con l'eccessiva peristalsi tramite le feci.⁽⁵⁾

L'autore Marco Pignatti⁽⁵⁾ ha voluto evidenziare anche un'altra tematica molto frequente che può andare in qualche modo a sfavorire il microbiota: lo stress.

Spesso lo stress viene preso in causa per dare una spiegazione a disturbi in altro modo incomprensibili, tuttavia la vita frenetica che caratterizza la maggior parte della popolazione può sicuramente mettere davanti situazioni stressanti che un individuo può riuscire a superare nei migliori dei modi o viceversa ricadere in stati di ansia, rabbia o paura che, come abbiamo già anticipato, vanno ad influire negativamente sul microbiota intestinale. Infatti il libro dichiara che in uno studio fatto su topi in seguito a situazioni di stress psicosociale cronico si osservi un aumento di *Clostridium* e *Roseburia* e una diminuzione di *Bacteroides* e *Parabacteroides*.

Inoltre uno studio condotto su cosmonauti sovietici (1987, Lizko) osservò al loro ritorno una perdita notevole di *Bifidobacteria* e *Lactobacillus* che portò conseguentemente anche ad un aumento della colonizzazione di potenziali patogeni. Questa alterazione è stata spiegata notando una diminuzione nella produzione di mucina e mucopolisaccaridi che in condizioni normali impedirebbero l'aderenza degli organismi patogeni sulla mucosa intestinale.

Molto interessante è notare altri studi di tipo osservazionale i quali riportano cambiamenti della comunità microbica in soggetti in condizioni di rabbia o paura: si evidenzia un aumento del 30% di *Bacteroides fragilis subsp. thetaiotaomicron* nelle feci, alterazione che comunque ritorna ai livelli fisiologici al calare dello stato di inquietudine. Quest'ultimo caso è spiegabile con l'aumento dell'adrenalina in seguito a segnali di stress che va ad aumentare la motilità

intestinale e il flusso biliare (la bile è un fattore che va a potenziare di molto lo sviluppo di *B. fragilis subsp. thetaiotaomicron.*)⁽⁵⁾

1.4 Il sistema immunitario

Il sistema immunitario è l'insieme di cellule e organi specializzati nella difesa dell'organismo nei confronti di agenti riconosciuti come estranei, definiti antigeni. Le sue funzioni sono quelle di protezione da microrganismi patogeni, rimozione delle cellule danneggiate o morte dai tessuti e in fine il riconoscimento di cellule anomale, come per esempio quelle tumorali, per poi eliminarle ed evitare la formazione neoplastica.

Fin dalla nascita siamo caratterizzati dal sistema immunitario di tipo innato (naturale), ovvero una risposta aspecifica (agisce sempre in modo uguale nei confronti di qualsiasi agente no-self, perché non dotata di memoria), in grado di svilupparsi in modo immediato e riconoscere molteplici antigeni, rappresentando quindi la prima arma di difesa per il nostro organismo. Nel corso della vita l'essere umano sviluppa anche una risposta di tipo adattativo (sistema immunitario adattativo), reazione che viene acquisita all'incontro di antigeni, sviluppando una memoria riferita come produzione di anticorpi i quali, una seconda volta si venga in contatto con la stessa molecola no-self, agiscono in modo specifico andando a reprimere la sua potenziale patogenicità. Si tratta di una risposta attivata precedentemente dal sistema immunitario innato e non è come nel primo caso immediata, ma richiede tempi più lunghi di azione dotata di esclusività di eliminazione di quel preciso antigene.

Il sistema immunitario è formato da organi detti linfoidi primari deputati alla generazione e maturazione delle cellule immunitarie (midollo osseo e timo) e quelli secondari, linfonodi, milza e tessuto linfoide associato alle mucose (MALT) dove risiedono le cellule immunitarie mature e vengono in contatto con eventuali antigeni.

Più precisamente il midollo osseo, presente all'interno delle ossa lunghe, è ricco di cellule staminali le quali sotto controllo di fattori tissutali e ormonali si differenziano nel processo di emopoiesi, dando vita a leucociti (globuli bianchi), eritrociti (globuli rossi) e piastrine. I leucociti, ovvero le cellule del sistema immunitario, includono linfociti, monociti e granulociti. I monociti vengono rilasciati dal midollo osseo e grazie alla circolazione sanguigna raggiungono i vari tessuti corporei dove maturano in cellule più grandi: macrofagi, in grado questi ultimi di fagocitare ed eliminare microrganismi, cellule morte e altre sostanze. I granulociti invece rappresentano tre tipologie di cellule diverse, i più rappresentati sono i neutrofili, anch'essi con attività fagocitica, gli eosinofili coinvolti nell'eliminazione di alcuni parassiti e in qualche reazione allergica e in fine i basofili, più rari, ma ricchi di granuli al loro interno, costituiti da eparina ed istamina rilasciate in caso di reazioni allergiche ed immunitarie. Tutte le cellule appena elencate fanno parte dell'immunità immediata, in grado di agire nel breve periodo; in più si aggiungono le cellule natural killer, predisposte ad uccidere le cellule infettate da patogeni o anche cellule anomale tra cui quelle tumorali, fin dal momento in cui vengono formate.

Inoltre si ricorda la formazione anche delle cellule dendritiche, sempre nel midollo osseo, atte a legare antigeni e presentarli ai linfociti i quali, in seguito, daranno una risposta di tipo adattativo. Anche il cosiddetto sistema del complemento e le citochine contribuiscono all'immunità innata, rispettivamente nel primo caso si tratta di un insieme di trenta proteine che agiscono in sequenza, ognuna attiva a cascata la seguente, producendo l'attivazione della risposta antimicrobica e richiamando le altre cellule del sistema immunitario; mentre le citochine, non sono altro che molecole prodotte dai globuli bianchi, alcune hanno la funzione di attirare le cellule immunitarie nella zona interessata (infettata) inducendo una pro-infiammazione, altre, al contrario, inibiscono la risposta infiammatoria e apportano fattori di crescita utili per la rigenerazione del tessuto.

La restante classificazione delle cellule immunitarie è composta dai linfociti, suddivisi a loro volta in linfociti T e B. I linfociti B germinano e maturano a livello del midollo osseo, mentre i linfociti T nascono anch'essi dal tessuto mieloide, poi migrano verso il timo dove avviene la successiva maturazione. Il timo, come già precedentemente descritto, è un organo linfoide primario di forma bilobata nella cavità toracica, il quale cresce di molto nei primi anni di vita e poi invecchia sempre di più lungo il suo corso. Successivamente i linfociti maturi si dirigono verso gli organi linfoidi secondari dove risiedono e aspettano l'attivazione da eventuali antigeni, in questo stato vengono definiti linfociti naive. I linfonodi fanno parte di questi organi linfoidi secondari, vengono descritti come aggregati nodulari situati lungo i vasi linfatici, in grado di filtrare liquidi interstiziali dove può esserci la presenza di antigeni, quindi, molto semplicemente, eventuali sostanze estranee scorrono all'interno della linfa, raggiungono i linfonodi dove incontreranno i linfociti pronti a scatenare la risposta immunitaria contro di essi. Altro organo linfoide secondario è la milza, ad essa arriva sia sangue venoso che arterioso ed è ricca di macrofagi attivi nella captazione di patogeni che vengono trattenuti ed esposti al contatto con le altre cellule del sistema immunitario.

In fine, MALT e SALT, tessuti linfoidi associati alle mucose e cute; situati nelle eventuali porte di ingresso dei patogeni (mucosa orale, derma, mucosa intestinale, nasale e apparato urogenitale). Tali tessuti linfoidi sono formati da cellule specializzate in grado di internalizzare antigeni e patogeni, degradarli in peptidi che possono essere in questo modo riconosciuti dai linfociti ed essere quindi eliminati. Analizzando più in profondità i componenti dell'immunità acquisita, i linfociti antigene-specifici, possiamo suddividerli, come già anticipato, in due gruppi: linfociti T e linfociti B.

Le cellule B presentano sulla loro superficie un recettore per l'antigene definito BCR (B-cell receptor), che, in seguito al legame con la molecola no-self, il linfocita inizierà a proliferare e differenziarsi in plasmacellule. Queste ultime rappresentano la differenziazione effettrice dei linfociti B, ovvero esse sono in grado di produrre anticorpi rilasciati in forma solubile in tutto l'organismo.

Ci sono diversi tipi di anticorpi, noti anche come immunoglobuline (Ig), ma presentano tutti una specificità antigenica molto elevata, infatti sono capaci di legarsi e neutralizzare antigeni e patogeni in modo esclusivo. Si ricorda che i linfociti B rappresentano le cellule della memoria immunologica, poiché ogni qualvolta un organismo incontra un agente patogeno, il sistema immunitario provvederà a sviluppare anticorpi specifici contro quel determinato antigene, il

quale una seconda volta si venga in contatto con esso sia questo immediatamente eliminato (immunità umorale).

I linfociti T presentano invece sulla superficie di membrana, il TCR (T-cell receptor), molto simile all'immunoglobulina, ma con struttura e capacità di riconoscimento diversa. Mediante il legame con un nuovo antigene-TCR, la cellula T si attiva differenziandosi in uno dei tipi di linfociti T effettori: le cellule T citotossiche, impiegate nell'uccisione diretta di cellule infettate da patogeni, le cellule T helper che assumono un ruolo importante nella stimolazione dei linfociti B e dei macrofagi, aumentandone la loro funzionalità, e in fine le cellule T regolatrici in grado di sopprimere la risposta immunitaria una volta eliminato il pericolo.

1.4.1 Meccanismo d'azione del sistema immunitario

Nell'ipotesi in cui si venga in contatto con un determinato antigene, in prima battuta agirà la risposta immunitaria naturale.

Le cellule in grado di fagocitosi, macrofagi, cellule dendritiche e neutrofili principalmente, sono capaci di riconoscere sistemi molecolari associati ai patogeni (PAMP) tramite dei recettori denominati PRR, vanno quindi ad identificare strutture espresse comunemente da molti agenti microbici come per esempio il lipopolisaccaride dei batteri, peptidoglicani, alcune proteine, RNA, acidi lipoteicoici. Dopo il riconoscimento, fagocitano il patogeno e lo degradano al loro interno, producendo molecole presentanti l'antigene che successivamente verranno esposte nella loro superficie esterna per presentarle ai recettori dei linfociti naive, che a loro volta si attiveranno producendo la risposta più specifica, ma che impiegherà un periodo di tempo più lungo per essere effettiva. Questo fa intendere la necessaria collaborazione iniziale da parte del sistema immunitario innato per l'attivazione di quello adattativo.

I linfociti T naive, come già riportato precedentemente, si ritrovano in stato inattivato a livello degli organi linfoidi secondari e aspettano l'arrivo delle cellule fagocitarie con l'antigene esposto. Un dettaglio importante che prima non è stato espresso, è il fatto che i linfociti T espongono sulla membrana cellulare esterna una proteina essenziale per la differenziazione da linfociti T citotossici ed helper.

Le cellule T naive che presentano la proteina CD8 sono destinate a diventare linfociti citotossici, mentre quelle con la CD4 cellule T helper, distinguendosi più precisamente in T_H1 , T_H2 , T_H17 e cellule T_{FH} (follicolari-helper).

Tutti questi sottotipi di cellule T_H effettrici inducono processi differenti, i T_H1 aumentano il potenziale di uccisione da parte dei macrofagi secernendo particolari citochine, le cellule T_H2 sono invece più specifiche nelle risposte alle infezioni sulle mucose, la diversità sta nella generazione di altre determinate citochine che condividono meccanismi d'azione coinvolti anche nelle reazioni allergiche (aumentano la produzione di muco che agirà da barriera fisica, richiamano gli eosinofili e una precisa classe di anticorpi, le IgE).

In fine le T_H17 e T_{FH} che rispettivamente, le prime promuovono il richiamo dei neutrofili, utili nell'eliminazione di agenti extracellulari e funghi, le seconde invece mediano il reclutamento dei linfociti B.

Definite le diverse cellule T effettrici, è importante capire come avviene il riconoscimento da parte di esse dei diversi antigeni.

Le cellule T naive tramite il TCR identificano l'antigene che viene esposto dalle cellule APC (Antigen-Presenting Cell), ovvero cellule dendritiche e macrofagi; questo passaggio di riconoscimento sarà fondamentale per attivare le cellule T effettrici, ma nel contempo si hanno anche delle interazioni supplementari tra le proteine CD8 o CD4 con le molecole MHC.

L'MHC (complesso maggiore di istocompatibilità) viene esposto dalle cellule bersaglio, più dettagliatamente, dopo che gli antigeni sono processati all'interno delle cellule, questi vengono legati alle molecole MHC e portati sulla loro superficie esterna.

Esistono due tipologie di MHC dominanti: MHC di classe I e MHC di classe II. I linfociti T CD8 riconoscono i frammenti antigenici esposti dagli MHC di classe I, mentre i T CD4 sono associati agli MHC di classe II. La molecola MHC di classe I può essere presentata da tutte le cellule dell'organismo, ovviamente quelle colpite dal patogeno, quindi su di esse agiranno i linfociti citotossici provocando la lisi delle cellule infette; mentre quello di classe II solamente dalle cellule APC che metteranno in azione i linfociti T helper.

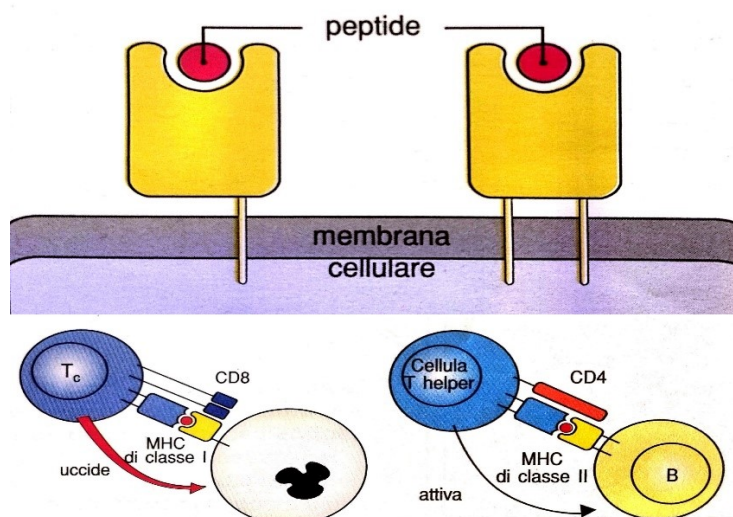


Figura 7. “Struttura MHC di classe I e di classe II. A sinistra la cellula T citotossica riconosce il complesso del peptide virale con il MHC di classe I ed uccide la cellula infetta. A destra la cellula T helper riconosce il complesso del peptide antigenico con il MHC di classe II ed attiva la cellula B (al posto del linfocita B può esserci un macrofago che sarà legato da un linfocita T_H1).” ⁽⁸⁾

Una volta attivati i linfociti T helper si ha la produzione di citochine di tipo diverso che richiameranno altre cellule del sistema immunitario, macrofagi e neutrofili che fagociteranno e uccideranno al loro interno i microrganismi, eosinofili e basofili che tramite i loro granuli ricchi di enzimi e sostanze tossiche sono in grado di degradare parassiti più grandi in frammenti più piccoli disponibili più facilmente per le cellule fagocitarie e in fine l'essenziale attivazione dei linfociti B che sintetizzeranno immunoglobuline e svilupperanno la memoria immunologica.

Si ricorda che dopo l'attivazione del linfocita naive, esso impiega circa 4-5 giorni a differenziarsi a cellule effettrici in modo completo, quindi si può intendere che una risposta

acquisita avvenga solo dopo alcuni giorni da quando l'infezione è stata identificata dalle cellule del sistema innato.

Nella figura 8 si può vedere in modo schematico un esempio di ciò che è stato riportato sopra.

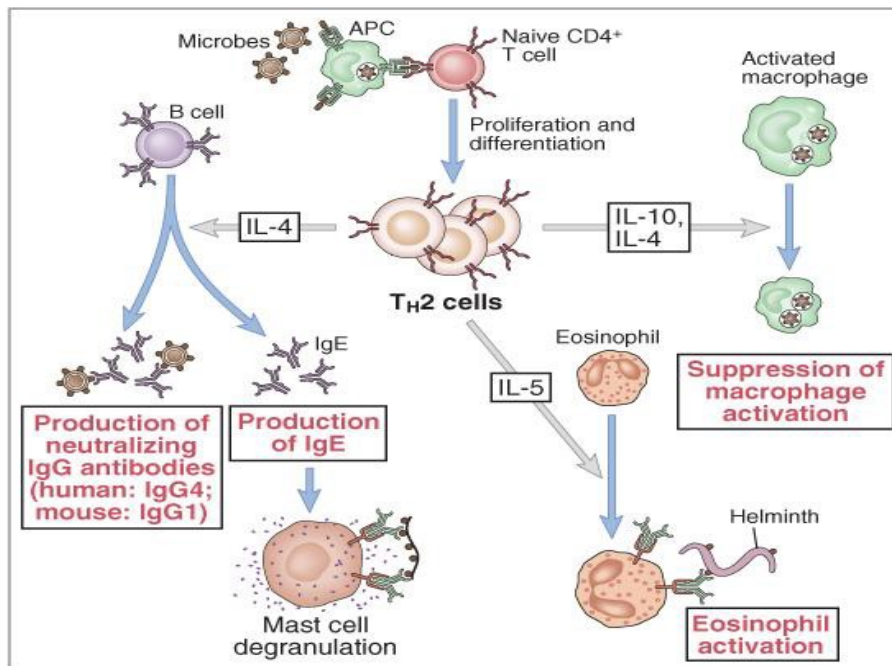


Figura 8. “Processo di riconoscimento dell’antigene da parte di una cellula T CD4 con successiva produzione di interleuchine (IL), tipi di citochine, che a loro volta attivano cellule immunitarie effettrici diverse.”

Finora si è trattata in dettaglio la risposta immunitaria mediata dalle cellule T; in seguito si pone l’attenzione sull’altra categoria di cellule effettrici, i linfociti B, e i loro meccanismi d’azione tramite gli anticorpi.

Gli anticorpi o immunoglobuline (Ig) hanno una struttura riconducibile alla lettera Y, presentano più precisamente una porzione costante (catene pesanti) che differenzia i vari tipi di classi anticorpali con funzionalità distinta (IgM, IgD, IgG, IgE, IgA) e una porzione variabile (catene leggere) in grado di legare l’epitopo, ovvero la parte dell’antigene riconosciuta solo dai linfociti.

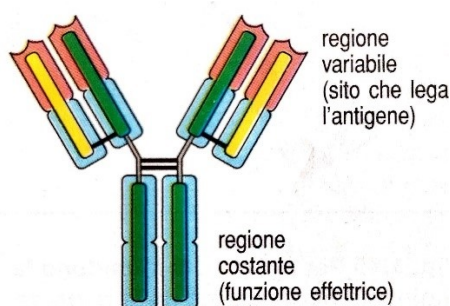


Figura 9. “Struttura schematica della molecola di un anticorpo” ⁽⁸⁾

Queste immunoglobuline si trovano nel circolo sanguigno e nei liquidi extracellulari e hanno diversi meccanismi d'azione, i quali si possono riconoscere come: neutralizzazione, opsonizzazione e attivazione del complemento.

Nel caso della neutralizzazione gli anticorpi si legano al patogeno evitando così la sua entrata nelle cellule che potrebbero essere infettate.

Alcuni batteri sono rivestiti da strutture che non sono percepite dai PRR delle cellule fagocitarie, in questo modo sfuggirebbero alla risposta innata, ma fortunatamente esiste una classe anticorpale che riconosce questi complessi strutturali, si lega ad essi e successivamente media il contatto con i fagociti che grazie a dei recettori riconoscono l'insieme anticorpo-antigene e permettono così la fagocitosi; si tratta in questo caso dell'opsonizzazione.

Per ultimo si ha l'attivazione del complemento, la regione costante di un anticorpo può essere in grado di dare il via alla prima proteina del sistema e a cascata l'attivazione di tutte le altre che andranno ad amplificare la risposta immunitaria.

Nei diversi distretti corporei si localizzano classi di anticorpi diversi che avranno, ovviamente, anche meccanismi effettori differenti in base alle catene pesanti di cui sono costituiti. La struttura delle varie immunoglobuline si può osservare nella figura 10, dove si percepisce la capacità delle IgM e IgA di polimerizzare (solo dopo essere state secrete), e in seguito si andrà ad approfondire le loro precise caratteristiche e attività ad esse associate.

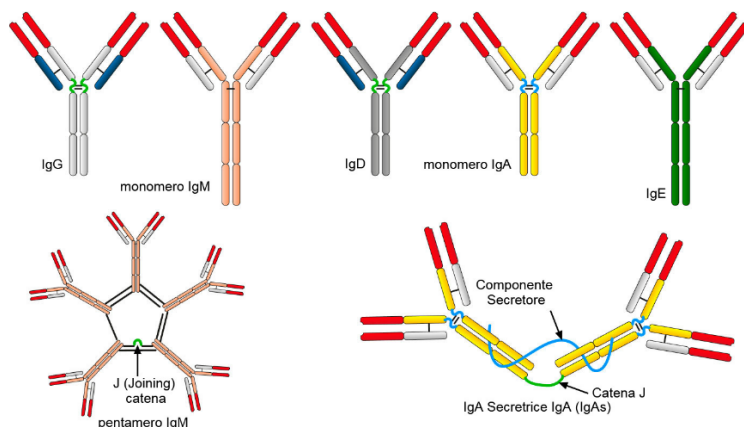


Figura 10. “Le immunoglobuline” ⁽⁹⁾

Nella fase iniziale della risposta umorale, i linfociti B naive presentano sempre sulla loro superficie IgD e IgM monomeriche. Nel momento in cui essi vengono attivati dalle cellule T_H, le plasmacellule secernono nel plasma gli anticorpi specifici di tipo M che tenderanno, così in forma libera, ad assemblarsi tra loro dando la forma pentamerica. Con questa conformazione sono in grado di legare fino a 10 antigeni diversi; sempre per questa struttura abbastanza ingombrante, le IgM si ritrovano principalmente nel sangue e molto meno nei vari tessuti, nei quali prevalgono altri tipi di classi anticorpali. Le IgM agiscono maggiormente attivando il sistema del complemento e le possiamo ritrovare dopo 5-7 giorni dall'immunizzazione nel sangue. Le varie classi anticorpali possono subire uno switch delle catene pesanti, cambiando così la loro funzionalità, mantenendo però quelle variabili che determineranno sempre il riconoscimento dello stesso antigene. Il suddetto cambio di conformazione avviene in base alla

specificità d'azione che ogni immunoglobulina diversa presenta e soprattutto in base al compartimento corporeo su cui queste devono agire.

Per questo durante il processo di immunizzazione vengono a formarsi precise classi anticorpali maggiormente funzionali al tipo di agente patogeno da colpire. Le classi IgG, IgA ed IgE, essendo più piccole (monomeri e dimero per la IgA) migrano dal sangue ai tessuti svolgendo attività diverse, funzionali alle loro catene pesanti. Le immunoglobuline G sono numerose nei tessuti extracellulari ed operano efficacemente l'opsonizzazione dei microrganismi facilitandone la loro fagocitosi da parte dei macrofagi e cellule dendritiche, inoltre agiscono anche attivando il complemento. Le IgA si ritrovano in primo luogo nelle secrezioni (latte, saliva, lacrime, muco), sono quindi rilasciate dalle plasmacellule a livello delle mucose, soprattutto quella del tratto digerente e dei bronchi, e rappresentano anche una prima arma di difesa per il neonato che introduce il latte materno ricco di esse. Questa classe anticorpale agisce per lo più mediante il sistema di neutralizzazione. Le IgE, invece, caratterizzano il sotto-cute e mucose, ritrovandosi a bassi livelli nel sangue. Esse sono destinate a legarsi ai mastociti e basofili, cellule che contengono granuli di mediatori infiammatori e altre sostanze che concorrono nell'eliminazione dell'agente infettante, provocandone quindi la degranulazione. Questo processo sta anche alla base di molte reazioni di ipersensibilità. In fine le IgD possono essere semplicemente sintetizzate come i recettori delle cellule B in quanto il loro meccanismo d'azione non è ancora noto del tutto.

In seguito, per completezza, si nota la figura 11 che riporta lo sviluppo della risposta umorale, dall'attivazione delle cellule B alla formazione dei precisi anticorpi, e la figura 12 che indica in modo schematico e sintetico l'attività funzionale e la distribuzione delle varie immunoglobuline.

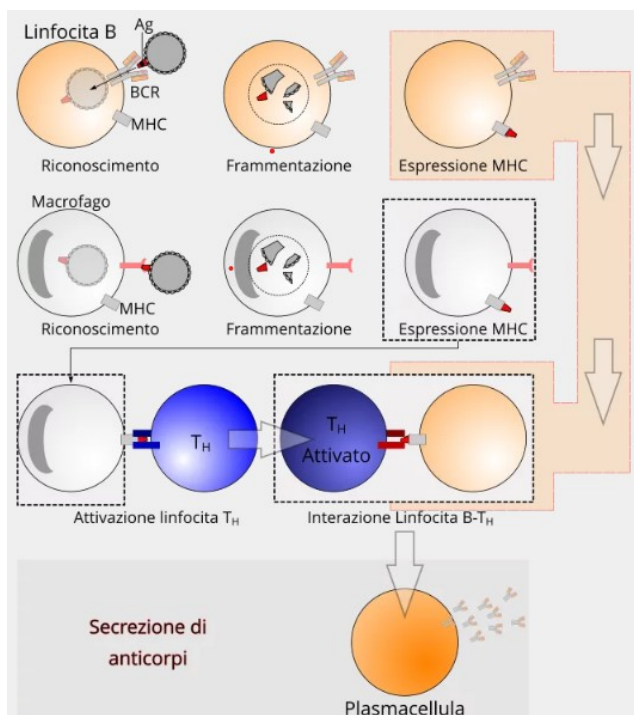


Figura 11. "Risposta immunitaria umorale" ⁽¹⁰⁾

Attività funzionale	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralizzazione	+	-	++	++	++	++	++	-
Opsonizzazione	+	-	+++	*	++	+	+	-
Sensibilizzazione per l'uccisione da parte delle cellule NK	-	-	++	-	++	-	-	-
Sensibilizzazione dei mastociti	-	-	+	-	+	-	-	+++
Attivazione del sistema del complemento	+++	-	++	+	+++	-	+	-
Distribuzione	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Trasporto attraverso l'epitelio	+	-	-	-	-	-	+++ (dimeri)	-
Trasporto attraverso la placenta	-	-	+++	+	++	+/-	-	-
Diffusione nei siti extravascolari	+/-	-	+++	+++	+++	+++	+++ (monomero)	+
Livello sierico medio (mg ml ⁻¹)	1,5	0,04	9	3	1	0,5	2,1	3x10 ⁻⁵

Figura 12. “Ciascuna classe delle immunoglobuline umane possiede funzioni specializzate ed un distribuzione caratteristica.” ⁽⁸⁾

1.5 Le allergie alimentari

Le allergie alimentari fanno parte delle reazioni di ipersensibilità di tipo I, ovvero mediate dalla produzione di IgE contro un allergene, sostanza presente anche negli alimenti che scatena una sensibilizzazione contro di esso, perché riconosciuto come antigene da parte del sistema immunitario. Questo tipo di reazioni richiedono una prima esposizione del sistema immunitario dell'individuo all'allergene; il sistema immunitario verrà sensibilizzato producendo anticorpi IgE contro la medesima sostanza definita, in seguito a questo motivo, “allergizzante”. Al secondo contatto con l'allergene, questo verrà riconosciuto dalle IgE specifiche che si legheranno alle cellule effettrici che esprimono il recettore FcεRI provocando così la degranolazione dei mastociti e il richiamo di basofili ed eosinofili che amplificano la reazione di ipersensibilità.

I mastociti sono presenti maggiormente nei tessuti e sono in grado, nelle circostanze sopra elencate, di rilasciare mediatori pro-infiammatori, enzimi proteolitici e istamina, quest'ultima è un'ammina vasoattiva la quale aumenta di molto il flusso ematico e la permeabilità a livello della zona locale interessata. L'istamina amplifica inoltre l'attività infiammatoria richiamando cellule TH1.

Gli enzimi rilasciati sempre dai mastociti, degradano le proteine della matrice extracellulare causando in questo modo la lesione dei tessuti. Le cellule coinvolte inoltre rilasciano citochine e chemochine che queste cellule rilasciano, come per esempio TNF α , che aumenta l'espressione di molecole di adesione per l'ingresso di linfociti pro-infiammatori nella zona sensibilizzata.

Tutta questa cascata di eventi provoca una serie di sintomi nel soggetto allergico, alcuni soggetti manifestano edema nella mucosa orale al contatto con l'allergene alimentare, dolori gastrointestinali dovuti alle sostanze rilasciate dai mastociti attivati nella mucosa che danneggiano l'epitelio e aumentano la contrazione muscolare portando a vomito e diarrea per

cercare di eliminare velocemente l'allergene. Inoltre se l'allergene riesce a raggiungere il circolo sanguigno può dare orticaria o una reazione anafilattica che può causare un collasso cardiovascolare e quindi portare in molti casi anche alla morte.

Manca ora da capire come una sostanza presente all'interno del cibo possa indurre una sensibilizzazione da parte di anticorpi IgE.

Gli allergeni alimentari sono rappresentati da proteine che resistono alla degradazione della pepsina nello stomaco e riescono a raggiungere la mucosa dell'intestino tenue dove sono localizzate cellule dendritiche e mastociti.

Durante la prima esposizione, le cellule dendritiche si caricheranno dell'allergene favorendo poi il contatto con le cellule naive T_H2 , in seguito questo fenotipo di cellule T produrrà molteplici citochine, IL-4 e IL-13 in modo particolare, che inducono la formazione da parte delle cellule B di immunoglobuline della serie E, le quali, come si è già descritto, daranno una risposta di ipersensibilità nel contatto successivo con l'organismo. Questo meccanismo è condiviso con quello di difesa da parassiti multicellulari che si possono ritrovare nelle zone di ingresso del corpo, come l'intestino.

In condizioni generiche normali le cellule dendritiche delle mucose tendono ad inibire, nel caso in cui non ci sia un'infezione, le probabili risposte allergiche tramite la produzione di IL-10, ovvero conducono la generazione di cellule T regolatorie, sempre a partire dalle cellule T CD4 naive, le quali limitano le risposte delle altre cellule T e mediano lo stato di tolleranza all'antigene.

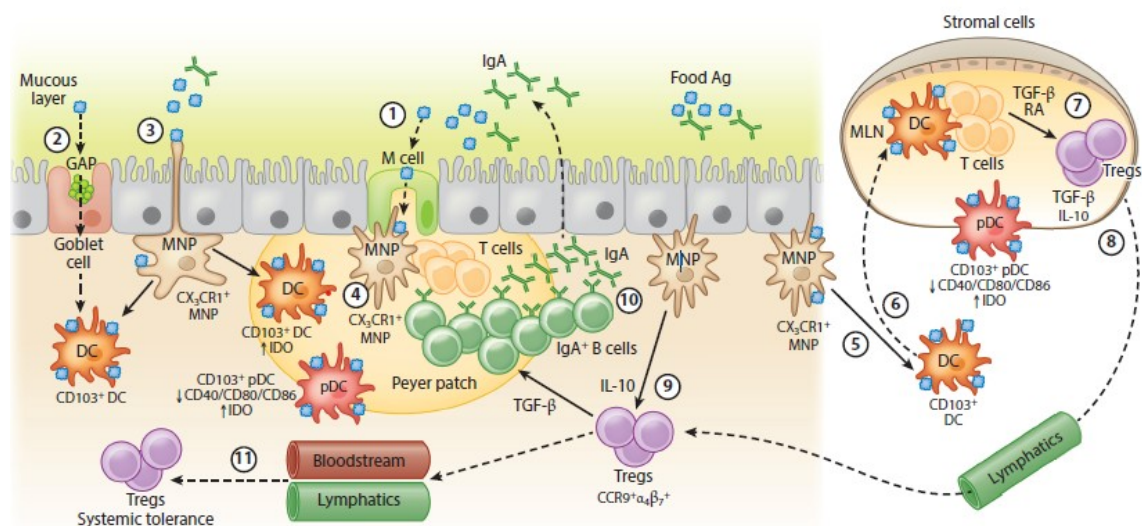


Figura 13. “Processo di tolleranza agli antigeni alimentari. Gli antigeni luminali vengono traslocati attraverso la barriera epiteliale intestinale tramite le cellule M (1) o le GAP (2). Le MNP CX3CR1+ trasferiscono gli antigeni luminali alle CD103+DC e alle pDC (5) che si dirigono verso le MLN drenanti (6) e mostrano l'antigene alle cellule T naive, favorendo la generazione di Tregs specifiche per l'antigene alimentare (7) che si dirigono attraverso i linfatici. (8) L'IL-10 derivata dalle MNP promuove la proliferazione delle Treg (9). Il TGF-β prodotto dalle Treg regola la commutazione della classe anticorpale delle cellule B in IgA; le IgA agiscono per escludere gli antigeni alimentari luminali (10). Le Treg proliferanti escono infine dall'intestino ed entrano in circolo per promuovere la tolleranza sistemica all'antigene alimentare (11).” (11)

Coesistono vari fattori che portano a una maggiore probabilità per l'individuo di sviluppare il processo di elaborazione di anticorpi IgE, piuttosto che quello della tolleranza. In modo considerevole, fattori genetici contribuiscono all'insorgenza dell'ipersensibilità di tipo I; nella popolazione sono presenti soggetti riconosciuti "atopici", ossia persone predisposte a diventare sensibilizzati attraverso il processo IgE mediato. L'atopia di questi individui viene riconosciuta per i più alti livelli totali nel sangue di IgE ed eosinofili rispetto alle "non atopiche". Questo può essere spiegato con lo studio del loro genoma, dove si nota una maggiore preponderanza di gruppi di geni che mettono in relazione citochine che accentuano il cambio di classe delle IgE e che determinano una maggiore preponderanza di eosinofili e mastociti.

Un altro fattore da non sottovalutare è quello ambientale che può comprendere: cambiamenti nella dieta, eccessiva igiene, diminuzione della diversità del microbiota intestinale, eccessivo uso di antibiotici, compromissione della mucosa intestinale; tutti elementi preponderanti nei Paesi industrializzati in cui si verifica una maggiore incidenza degli eventi allergici.

Le cause ambientali sopra citate sono attinenti con una modificazione negativa del microbiota intestinale approfondita nel capitolo 1.3; l'ipotesi prevalente prevede che una disbiosi intestinale sia correlata o rappresenti addirittura l'evento scatenante per l'insorgenza di malattie allergiche alimentari.

Nel prossimo sotto capitolo, infatti, si andrà ad approfondire la relazione tra il microbiota intestinale e le allergie alimentari, sottolineando come il microbioma possa proteggere o, viceversa, aumentare il rischio di allergie.

1.5.1 Relazione tra il microbiota intestinale e le allergie alimentari

Il microbiota intestinale è in stretta sinergia con il sistema immunitario e quindi di conseguenza anche con la comparsa di malattie allergiche.

Nella fase intrauterina il feto è protetto maggiormente da linfociti T_H2 ; ciò è essenziale per non innescare una eventuale risposta immunitaria da parte di linfociti citotossici che comporterebbe l'aborto. Come già spesso è stato spiegato, i linfociti T_H2 innescano la produzione di IgE da parte delle cellule B che implicherebbero un maggior rischio di eventi allergici.

Durante le prime fasi di vita del neonato, la stimolazione da parte di microrganismi commensali è importante per favorire la generazione di risposte regolatorie attraverso lo sviluppo della molecola $TGF\beta$ che induce la sintesi di IgA piuttosto che di IgE e lo stato di tolleranza.

$TGF\beta$ è secreto in forma non attiva ed è attivato da specifiche integrine, $\alpha_v \beta_8$, espresse maggiormente durante uno stato infiammatorio attivato da batteri commensali mediante segnale TLR (Toll-like receptor) -dipendente. ⁽¹¹⁾

Il microbiota intestinale, come si è già anticipato nel capitolo 1.2, sintetizza, a partire dai substrati alimentari, gli SCFA, acidi grassi a corta catena, i quali si sono rivelati interessanti nella generazione dello stato di tolleranza, questo perché, soprattutto il butirrato, stimola la differenziazione di cellule T regolatorie, fondamentali per ottenere questo effetto. Molti studi hanno confermato che la comunità batterica intestinale modula la generazione e lo sviluppo delle cellule effettrici allergiche, andando a limitare la produzione di precursori di basofili,

derivanti dal midollo osseo, e diminuendo la concentrazione di citochine T_H2 che probabilmente scatenerebbero il meccanismo allergico.

Alcuni batteri, come *Clostridia*, sono in grado di stimolare la produzione di citochina IL-22, la quale a sua volta provoca una maggiore secrezione da parte delle cellule intestinali di muco, evitando così che antigeni alimentari possano arrivare a stretto contatto con la mucosa o raggiungere il circolo dando origine a fenomeni di sensibilizzazione. Tale esempio sottolinea il ruolo del microbiota intestinale nella protezione da allergie alimentari. Numerosi studi evidenziano il legame tra la tolleranza ad antigeni alimentari e la presentazione del lipopolisaccaride (LPS) batterico al sistema immunitario intestinale. Studi condotti con topi germ-free oppure trattati con antibiotici ad ampio spettro nei quali viene meno l'attivazione di TLR4 (recettore specifico nel riconoscimento del lipopolisaccaride) riportano una maggiormente suscettibilità agli allergeni alimentari degli animali. ⁽¹¹⁾

Nei prossimi sotto capitoli si caratterizzano in modo più preciso le allergie associate al latte, alle proteine dell'uovo e alla tropomiosina di gamberetti. Questi assieme ad arachidi, soia, e grano rappresentano importanti allergeni alimentari. Tuttavia la ricerca bibliografica alla base di questa tesi ha evidenziato che studi sulla modulazione del microbiota intestinale mediante uso di probiotici sono stati compiuti solo per i tre allergeni riportati sopra.

1.5.2 Allergia al latte

Il latte vaccino è uno degli alimenti che fin dal passato caratterizza in modo significativo l'alimentazione umana. Non si parla soltanto del prodotto così come tale, ma anche dei suoi derivati come formaggi, burro, yogurt, inoltre esso si ritrova anche come ingrediente in molte ricette sia dolci che salate.

Dal punto di vista nutrizionale il latte è ricco di molti nutrienti essenziali utili soprattutto nella mineralizzazione e crescita ossea, per questo rappresenta sicuramente una buona fonte alimentare nella fase di sviluppo adolescenziale.

Nonostante tutti questi punti di forza, il latte vaccino fa parte della lista di allergeni alimentari, ovvero le sue proteine, quali $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β - e κ -caseina e quelle del siero α -lattoalbumina e β -lattoglobulina.

Secondo lo studio di C. Lifschitz e H. Szajewska ⁽¹²⁾ soffrono di allergia al latte circa il 2-3% dei bambini del mondo occidentale ed è molto raro che questa insorga durante l'età adulta. I sintomi possono presentarsi già nei primi sei mesi di vita e nell'80% dei casi svaniscono entro i 16 anni di età; si possono manifestare come orticaria, vomito, feci ematiche, mal di stomaco e anafilassi.

Il latte materno può contenere proteine derivate dai latticini ingeriti dalla madre che le può quindi trasmettere al lattante; nell'eventualità che questi sia sensibile ad esse manifesterà la reazione allergica, comportando consecutivamente il dovere da parte della donna di eliminare dalla propria dieta qualsiasi fonte dell'alimento.

Spesso si ricorre al latte di formula o preparati amminoacidici, ovvero prodotti di origine vaccina o di soia dedicati a soggetti con queste particolari esigenze. In tali alimenti, le proteine vengono idrolizzate in peptidi molto piccoli in grado di non essere riconosciuti dal sistema immunitario; si deve sottolineare il fatto che si tratta di alimenti speciali abbastanza costosi non accessibili a tutti. In più evitare l'allattamento naturale al seno priverà il bambino di tutti quei fattori protettivi che vanno a comporre la prima immunità del neonato, rendendolo maggiormente soggetto alle infezioni. È probabile sia necessaria l'integrazione di calcio, vitamina D e fosforo per mamme che evitano l'assunzione di cibi contenenti latte, ma anche per bambini che non lo ricevono direttamente dal seno e quindi possono risultare carenti in questi nutrienti utili per la loro crescita. ⁽¹²⁾

1.5.3 Allergia alle uova

Come il latte anche le uova fanno parte della lista di allergeni alimentari e non esiste alcun trattamento specifico se non eliminare dalla propria dieta tutte le fonti che possono contenere uova all'interno.

Secondo lo studio di D. Withanage Dona e C. Suphioglu ⁽¹³⁾ l'ipersensibilità derivata dalle proteine dell'uovo di gallina è una delle allergie alimentari più diffusa nei bambini, interessando circa il 9% in tutto il mondo. Di questi poi il 60-75% riescono a sviluppare tolleranza entro i 16 anni di età, ma la restante parte continua anche nella vita adulta, aumentando il rischio di reazioni sempre più severe.

Le proteine responsabili di reazione allergica si ritrovano sia nell'albume che nel tuorlo e sono specificate nella figura 14.

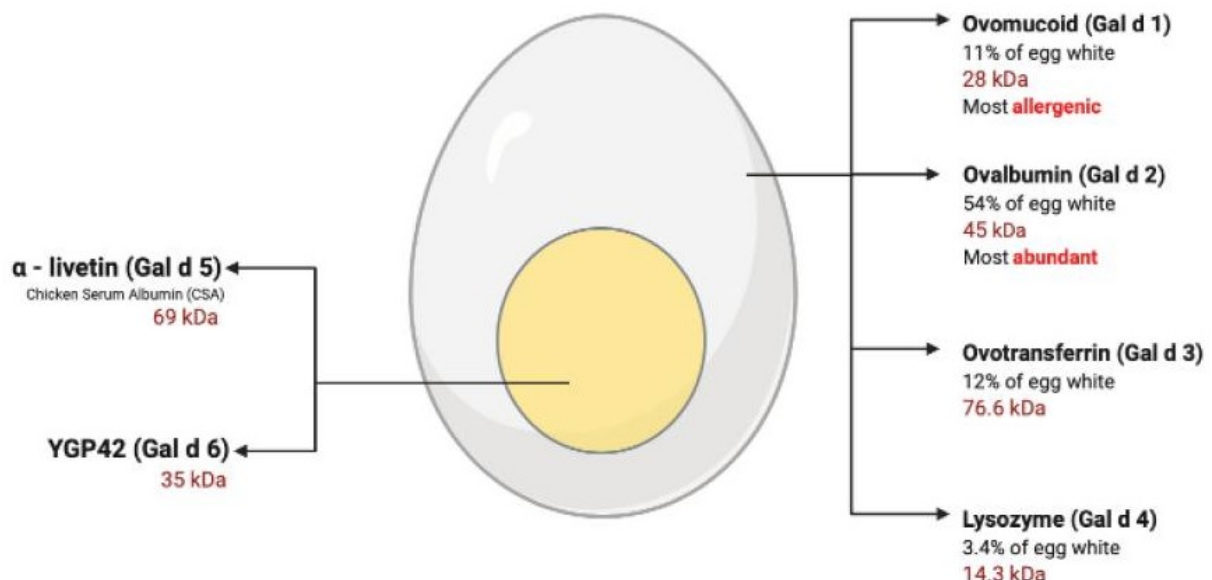


Figura 14. "Principali allergeni delle uova con alcune delle loro proprietà chimico-fisiche" ⁽¹³⁾

L'albume presenta quattro proteine sensibilizzanti, ovvero ovomucoide (Gal d 1), ovoalbumina (Gal d 2), ovotransferrina (Gal d 3) e lisozima (Gal d 4), mentre il tuorlo ne presenta due: α-

livetina (Gal d 5) e la glicoproteina YGP42 (Gal d 6). È risultato che i bambini siano maggiormente sensibilizzati dalle proteine contenute nell'albume, piuttosto che a quelle del tuorlo, al contrario gli adulti allergici alle uova reagiscono in maggior misura a Gal d 5 e alla YGP42. Infatti nei bambini in cui l'allergia persiste anche dopo i 16 anni, vengono ritrovate IgE specifiche delle proteine del tuorlo. Tuttavia, queste sei proteine non sono le uniche dotate di allergenicità, per questo la ricerca sta ancora valutandone altre, come per esempio l'apovitellenina I, l'apovitellenina VI e la fosvitina. La reazione allergica alle uova include sintomi come vomito, orticaria, dolore addominale, diarrea e nel peggiore dei casi può portare a shock anafilattico. ⁽¹³⁾

Le uova sono impiegate in una vasta gamma di prodotti, non solo quelli alimentari, ma anche farmaceutici, compresi i vaccini. L'allergia a questo alimento implica quindi l'eliminazione di moltissime fonti alimentari per il paziente, gravando così su aspetti carenziali della dieta, non togliendo anche il fatto che egli non possa accedere ad alcune categorie di medicinali che potrebbero essere fondamentali per la salute. Inoltre si ricorda che le uova rappresentano una fonte di proteine di buona qualità e apportano anche vitamine e minerali essenziali che concorrono al fabbisogno dell'organismo umano.

1.5.4 Allergia alla tropomiosina di gamberetti

La tropomiosina è la proteina allergica maggiormente responsabile dell'ipersensibilità ai gamberetti. Essa è tuttavia presente in tutti i crostacei e molluschi, i quali comprendono una grossa fetta del mercato alimentare. Il consumo di questi prodotti sta aumentando notevolmente e questo comporta una maggiore incidenza di fenomeni allergici da essi provocati. Ad oggi la percentuale di allergia ai crostacei raggiunge il 2,5% della popolazione mondiale.

La tropomiosina è implicata nella contrazione muscolare degli invertebrati ed è resistente al calore, la sua struttura rimane invariata anche con il processo di cottura e per questo reazioni di ipersensibilità da essa provocate possono generarsi sia con cibi crudi sia cotti. La sensibilizzazione da gamberetti avviene maggiormente per ingestione, ma è probabile che si verifichi anche tramite l'inalazione di vapori di questi crostacei. La tropomiosina dei gamberetti nel suo stato naturale è un omodimero costituito da due catene di α -elica avvolte l'una sull'altra. La sequenza che viene ricombinata e che si conserva in tutti gli invertebrati è definita Pen a 1, catene amminoacidiche simili a Pen a 1 possono indurre quindi cross-reazione.

I sintomi si manifestano più frequentemente con prurito generalizzato e angioedema delle labbra e della lingua, in alcuni casi si generalizza con malessere e capogiri, vomito, tosse oppure anche eventi più gravi come l'anafilassi. La tropomiosina dei gamberetti condivide per circa il 65% della sua sequenza quella di alcuni altri crostacei e molluschi, motivo per cui potrebbero verificarsi casi di sensibilizzazione non solo degli stessi gamberetti, ma anche da tutti quei prodotti ittici appartenenti alle due classi rispettivamente, ciò viene definito come fenomeno di cross-reattività. Ulteriormente più studi, come quello di Gelis S. *et al.* (2020) ⁽¹⁴⁾, evidenziano una notevole coincidenza tra allergia agli acari della polvere e a quella di gamberetti, la

motivazione è data dal fatto che anche gli artropodi presentano sequenze di tropomiosina che possono avere degli epitopi in comune e per questo scatenare la stessa reazione allergica. ⁽¹⁴⁾

In sintesi quindi, si può definire che tropomiosina rappresenti la proteina potenzialmente scatenante cross-reattività tra i crostacei, molluschi e acari. Nonostante la sua numerosa presenza in tutte le classi appena citate, la tropomiosina dei gamberi è stata la prima ad essere identificata come allergene ed è anche quella su cui si basano la maggior parte degli studi sulle reazioni allergiche.

Come in tutte le altre allergie alimentari l'unica soluzione per evitare la reazione allergica è l'eliminazione dalla propria dieta dell'alimento responsabile, il gamberetto, ma a causa della cross-reattività dovranno essere eliminati tutta la classe di crostacei e molluschi.

2. Probiotici nelle allergie alimentari

Nei capitoli precedenti si è messo in risalto il ruolo di protezione del microbiota intestinale nelle allergie alimentari, infatti, come già anticipato più volte, una sua disbiosi è correlata a casi di ipersensibilità. Questo concetto ha comportato il notevole interesse da parte della ricerca su come modulare la comunità batterica di questi soggetti al fine di ripristinare un equilibrio tra le specie microbiche che siano in grado di comportare una minore incidenza di reazioni allergiche. Questo studio, infatti, ha lo scopo di indagare la presenza in letteratura di articoli, fino ad oggi pubblicati, che supportino l'azione di determinati probiotici per modulare il microbiota intestinale, al fine di dare una soluzione, ad oggi quasi inesistente, alle persone che soffrono di allergie alimentari.

Nei prossimi sotto capitoli, prima di descrivere i vari studi che supportano i probiotici nelle allergie alimentari, si vuole fare un'analisi dei metodi e materiali di ricerca che sono stati utilizzati per condurre questa tesi compilativa.

2.1 Materiali e metodi utilizzati nella ricerca degli studi analizzati

Come primo passaggio si è valutato se esistessero in letteratura articoli riguardanti la correlazione tra disbiosi del microbiota intestinale e allergie alimentari, per fare questo si è utilizzato il motore di ricerca scientifico "PubMed", nel quale tramite le parole chiave "*food allergies and probiotics*" e "*use of probiotics in food allergies*", si sono riusciti ad ottenere molti risultati, tra i quali alcuni di essi erano attinenti alla tematica in esame, altri invece trattavano l'utilizzo di probiotici in allergie diverse da quelle alimentari o completamente argomenti poco inerenti. Per questo in secondo luogo è stata fatta una selezione degli articoli che avrebbero interessato questa tesi. Innanzitutto si è inserito un unico filtro dell'anno di pubblicazione, dedicandosi solo a studi usciti nel corso degli ultimi 10 anni, arrivando così a circa 450 risultati. Successivamente di questi si è preso in considerazione solamente quelli per i quali, leggendo il titolo e l'abstract, fossero di valore per questa tesi.

Così facendo si sono delineati 46 studi, 22 di questi esprimono il fatto che una alterazione della composizione microbica intestinale sia legata all'insorgenza di allergie alimentari e che un probabile utilizzo di probiotici potrebbe aiutare nella cura di queste, mentre i restanti 24 dimostrano l'applicazione di determinati ceppi batterici nell'alleviare i sintomi e l'incidenza di reazioni allergiche. In seguito sono stati suddivisi in due categorie i 24 studi: quelli testati su animali e quelli su uomo, è emerso che la maggior parte sia stata sperimentata su topo, ma in misura non da poco si sono rivelati essercene molti anche su uomo. È importante specificare che gli studi condotti su uomo trattassero tutti soggetti non adulti, questo in linea con il fatto già precedentemente riportato, che la percentuale di popolazione più colpita da questo tipo di reazioni rappresenti proprio i bambini.

In seguito è stata fatta un'ulteriore tabella dove si è riportato per ogni studio quale allergia alimentare fosse andato a trattare, da questo passaggio ci si è resi conto che la letteratura a riguardo abbia sperimentato fino ad ora solamente l'allergia al latte, uova e tropomiosina di gamberetti, infatti per questo la tesi si è basata sull'analisi di queste tre allergie. 12 studi sono stati condotti sull'allergia al latte (8 su uomo e 4 su topo), 5 su quella alle uova (tutti su modello murino) e in fine 2 sulla tropomiosina di gamberetti (entrambi su topo), per un totale di 19 studi. I 5 rimanenti dei 24 iniziali sono stati scartati perché prendevano in considerazione le varie allergie in modo generale e non si concentravano su un unico tipo di allergene alimentare.

2.2 Studi che supportano l'utilizzo di probiotici nelle allergie alimentari

Un numero sempre maggiore di studi conferma che il decorso delle allergie alimentari sia fortemente correlato con il microbioma intestinale, vengono infatti riconosciute specie che da un lato aumentano il processo di tolleranza, quindi considerate protettive, altre invece associate a una maggiore probabilità di sensibilizzazione. In letteratura infatti, cresce sempre di più l'interesse di evidenziare ceppi probiotici con potenzialità anti-allergiche, ciò viene fatto per esempio dallo studio di Shu, SA., *et al.* (2018) ⁽¹⁵⁾, nel quale riporta per ognuno di essi anche il meccanismo d'azione specifico con cui possono dare questa funzionalità. (Tabella 2)

Tabella 2. “Effetti anti-allergici di vari ceppi probiotici” ⁽¹⁵⁾

Ceppo probiotico	Tipo di studio	Effetti anti-allergici
<i>B. longo</i>	Studio clinico randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo [81]	Sintomi oculari alleviati in pazienti con allergia ai pollini, aumento dell'IFN- γ e diminuzione delle IgE
<i>B. breve</i>	In vitro utilizzando monociti umani [79]	Maturazione DC indotta e sopravvivenza prolungata attraverso TLR-2 con aumento della produzione di IL-10
<i>L. plantare</i>	In vitro utilizzando cellule RBL-2H3 [80]	Differenziazione soppressa delle cellule Th2 ed espressione di citochine associate a Th2, differenziazione promossa delle cellule Th1
	In vivo con topi [82]	Aumento del livello di IL-12 per sopprimere le IgE specifiche per Ag
<i>L. casei</i> (Shirota)	In vivo utilizzando topi OVA-TCR-Tg [83]	Aumento del livello di IL-12, riduzione dei livelli di IgE e IgG1 specifici per OVA
<i>L. fermentum</i>	In vivo utilizzando topi immunizzati con OVA [84]	Infiltrazione di cellule infiammatorie sopresse nelle vie aeree, IgE specifiche per OVA e espressione di mRNA di IL-4, IL-5, IL-13 e TGF- β
<i>L. ramoso</i> (LGG)	Topi in vivo trattati con LGG + EHCf [85]	Reazione cutanea allergica acuta ridotta, punteggi dei sintomi anafilattici, temperatura corporea; aumento dei livelli di IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ
	Topi in vivo trattati con LGG [86]	Punteggi di ipersensibilità ridotti e IgG1 specifiche per CMP; aumento dei livelli di IFN- γ e IgG2a specifici per CMP

Questi ceppi riguardano i generi *Bifidobacteria* e *Lactobacilli* testati in vivo e in vitro, essi, come descritto nella tabella di cui sopra, sono in grado di modificare alcune risposte immunitarie concorrendo al meccanismo di tolleranza, per questo motivo saranno sicuramente presi in considerazione negli studi interventistici che sperimentano il ripristino delle allergie alimentari mediante l'utilizzo di probiotici. ⁽¹⁵⁾

In concordanza allo studio sopra citato Berin MC. ⁽¹⁶⁾ esprime:

“Affinché i medici passino dallo studio della disbiosi umana alla terapia, è necessario identificare organismi protettivi, idealmente a livello di ceppo; identificare i metaboliti associati alla tolleranza; e per dimostrare le corrispondenti funzioni di regolamentazione in sistemi modello appropriati.” ⁽¹⁶⁾

Lo studio di Bunyavanich S, Berin MC. (2019) ⁽¹⁷⁾ denota che le allergie alimentari siano sempre precedute da una disbiosi intestinale e che i primi mesi di vita siano fondamentali per lo sviluppo del microbiota che poi inciderà, in termini compositivi, sul decorso di un'eventuale allergia alimentare. ⁽¹⁷⁾

In applicazione a questi concetti lo studio di Bao R., *et al.* (2021) ⁽¹⁸⁾ esamina il microbiota intestinale di coppie di gemelli che differiscono per allergia alimentare. Più precisamente partecipano alla ricerca 18 coppie di gemelli omozigoti, 13 di queste formate da un soggetto affetto da allergia e uno sano (discordanti per allergia alimentare), invece, per le restanti 5 coppie, entrambi dimostravano sensibilizzazione (concordanti per allergia alimentare); l'età dei soggetti compresa tra i 6 mesi e 58 anni. Nell'analisi vengono messe in risalto le differenze compositive del microbiota intestinale e del profilo di metaboliti fecali tra gemelli sani e quelli allergici.

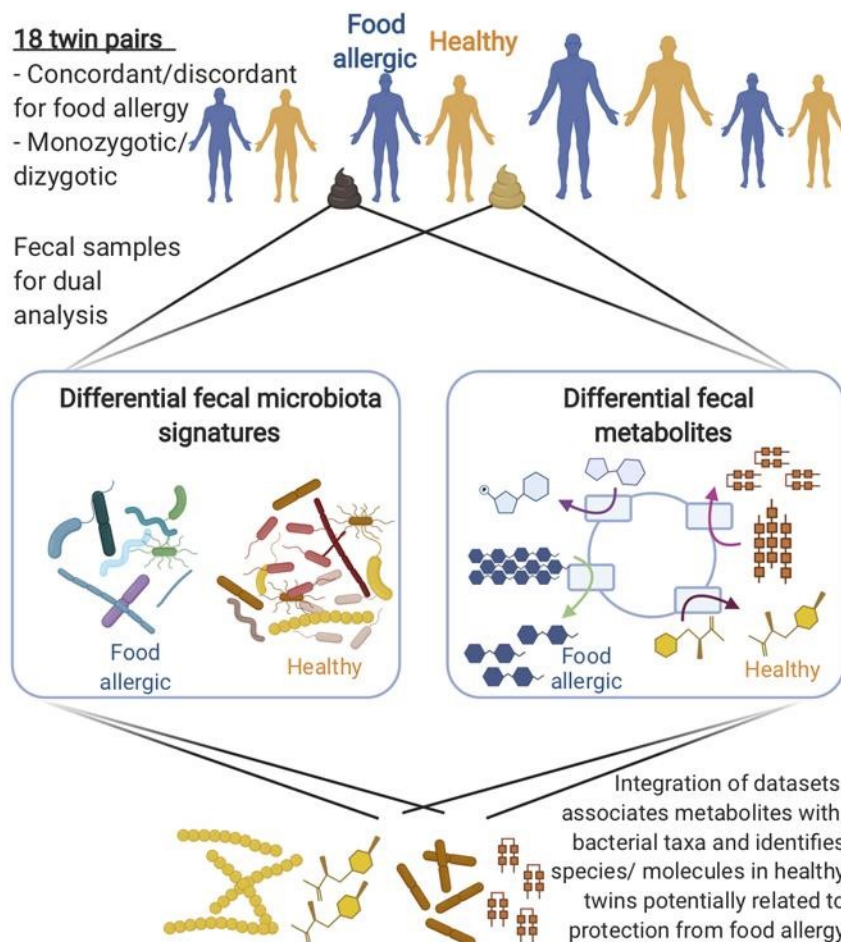


Figura 15. “Schema del piano di studio dell’analisi del microbiota intestinale e suoi metaboliti prodotti che si differenziano tra i gemelli sani e i gemelli allergici” ⁽¹⁸⁾

I risultati del sequenziamento dell'rRNA 16s hanno rivelato che la maggioranza dei casi sani presentasse un'abbondanza relativa di *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* (Clostridi). Per completezza lo stesso studio fa notare che *Lachnospiraceae* siano state riconosciute come protettive in topi trattati con allergia al latte.

Per quanto riguarda l'analisi dei metaboliti batterici, i ricercatori hanno caratterizzato due vie in grado di aumentare la tolleranza, ovvero quella del diacilglicerolo, correlata a una ricchezza di *Phascolarctobacterium faecium*, e quella del metabolismo di acidi grassi, amminoacidi e steroli della specie abbondante *Ruminococcus bromii*, ovviamente queste due specie caratterizzavano il microbiota di gemelli sani. ⁽¹⁸⁾

I prossimi sotto capitoli tratteranno in modo dettagliato i probiotici testati sulle specifiche tre tipologie di allergie alimentari discusse nel corso della tesi.

2.2.1 Probiotici nell'allergia al latte

Innanzitutto è bene fare una panoramica della composizione del microbiota intestinale di bambini che soffrono di allergia al latte. A riguardo Yudie Yang, *et al.* (2021) ⁽¹⁹⁾ hanno sperimentato in topi germ-free, non sensibili alle proteine del latte, il microbiota intestinale di neonati con allergia dimostrata. I topi si sono rivelati poi soffrire di allergia al latte rispetto ai modelli trattati con microbiota di neonati sani. Secondo le analisi di sequenzionamento i bambini allergici mostravano uno squilibrio in termini compositivi: un'abbondanza relativa nelle famiglie *Trichocomaceae*, *Ruminococcaceae* e nei generi *Bacteroides* e *Alistipes*, e viceversa una carenza di *Bifidobacterium*.

In aggiunta si è compiuta un'ulteriore analisi a lungo termine del microbiota di bambini allergici al latte, dimostrando che i soggetti con allergia risolta negli anni, rispetto ai compagni la quale sensibilizzazione non regrediva nel tempo, rappresentassero una ricchezza in *Clostridia* e *Firmicutes*. Con questi risultati si può derivare che i taxa batterici degli ultimi due generi appena citati possano essere studiati come potenziali probiotici nella cura dell'allergia alle proteine del latte. ⁽¹⁹⁾

Oltre ad aver messo in luce le probabili specie batteriche responsabili di una maggiore tolleranza per questa allergia, disponiamo anche di articoli che supportano una cura diretta del problema, ovvero vanno a suggerire l'uso di probiotici e prebiotici specifici e il trapianto di microbiota fecale sano.

Uno dei primi probiotici sperimentati per alleviare i sintomi allergici legati al latte è *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). A supporto lo studio di Berni Canani, *et al.* (2015) ⁽²⁰⁾ hanno provato una formula di caseina ampiamente idrolizzata supplementata con LGG (EHCF+LGG) in 12 neonati con allergia al latte, messi in confronto con altri 7 bambini, sempre allergici, ma con una formula di EHCF senza LGG. Alla fine del trattamento, ovvero dopo 12 mesi, l'articolo esprime i seguenti risultati:

“In totale, 5 neonati su 12 (42%) trattati con EHCF+LGG hanno sviluppato tolleranza alle proteine del latte vaccino, mentre tutti (7/7) dei neonati trattati con EHCF sono rimasti allergici” ⁽²⁰⁾

Ciò suggerisce che EHCF+LGG stimoli in qualche modo la tolleranza alle proteine del latte, infatti per andare più in profondità nella questione, Berni C. e i suoi colleghi hanno messo in risalto il fatto che i campioni fecali di bambini trattati con formula integrata con LGG avessero livelli di butirato molto più elevati rispetto all'altro gruppo. Si ricorda che il butirato regola la produzione delle cellule T regolatorie e aumenta la funzione di barriera epiteliale nel colon. La maggiore produzione di questo metabolita batterico era collegata a un'abbondanza rilevata dopo il trattamento con EHCF+LGG delle specie *Roseburia*, *Coprococcus* e *Blautia* che molto probabilmente sono state promosse da LGG stesso. Sempre nel campione di bambini divenuto tollerante si nota anche una riduzione significativa di *Bacteroides*.

Successivamente si è andati a porre l'attenzione sulla differenza all'interno del gruppo trattato con EHCF+LGG tra i 5 neonati che hanno sviluppato tolleranza e i restanti 7 che purtroppo sono rimasti allergici. Innanzitutto i bambini tolleranti presentavano livelli di butirrato maggiori ed erano più arricchiti dei generi *Roseburia* e *Blautia*, mentre i *Bacteroides* erano più rappresentati nei campioni fecali dei neonati rimasti allergici. Per poter spiegare il perché i 7 soggetti non avessero presentato alcuna guarigione, gli esperti sono andati a verificare se ci fossero differenze della composizione microbica intestinale, sia prima che dopo il trattamento con EHCF+LGG. Da questa analisi si nota che i campioni iniziali pre-EHCF+LGG non mostrino diversità nei generi tra i due gruppi, mentre in quelli post-trattamento si evidenzia un livello di *Oscillospira* discordante, i 7 allergici ne dimostravano una abbondanza. ⁽²⁰⁾

Sempre lo stesso autore Berni C. nel 2016 ⁽²¹⁾ eseguì un secondo studio sull'utilizzo dello stesso probiotico, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), in associazione anche questa volta a una formula di caseina ampiamente idrolizzata (EHCF+LGG). In questo caso la sperimentazione dura per tre anni, rispetto al precedente di soli 12 mesi, e prende in considerazione un campione più ampio di 220 neonati allergici al latte: 110 trattati con EHCF+LGG e 110 solo con EHCF senza LGG.

Per questi soggetti si andava a visualizzare l'eventuale insorgenza di sintomi allergici come orticaria, eczema, asma e rinocongiuntivite e l'acquisizione della tolleranza verificata a 12, 24 e 36 mesi. Come descritto nei grafici (Figura 16) (Figura 17) la formula EHCF+LGG ha dimostrato una risoluzione dei sintomi allergici adeguata e soprattutto un buon raggiungimento della tolleranza a 36 mesi, rispetto alla formula priva di LGG.

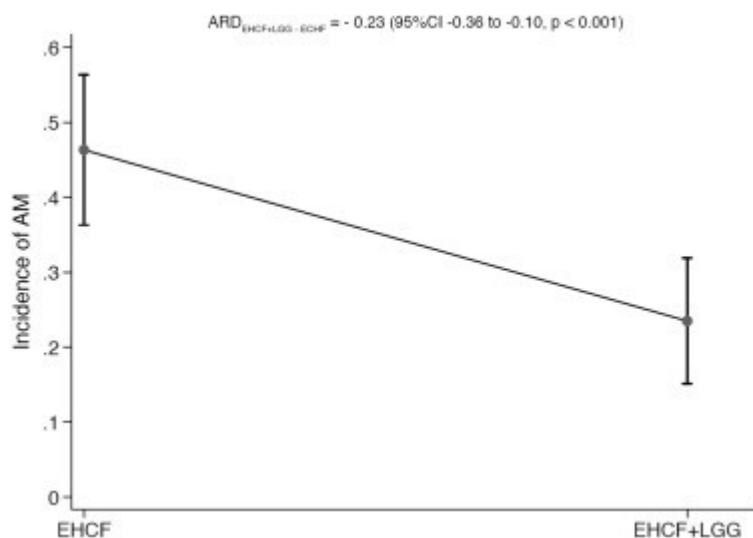


Figura 16. "Incidenza dei sintomi di allergia al latte" ⁽²¹⁾

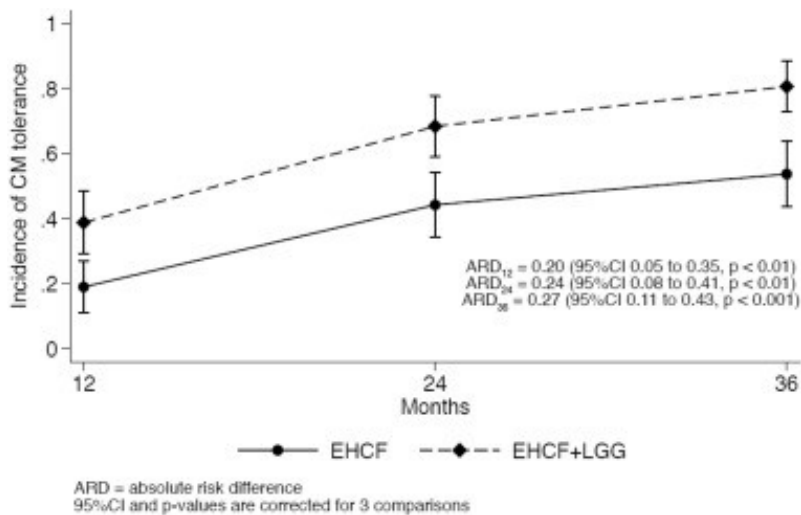


Figura 17. “Incidenza della tolleranza all’allergia al latte” (21)

In conclusione il probiotico *Lactobacillus rhamnosus* GG si dimostra essere una probabile soluzione entro 3 anni dalla sua assunzione, un periodo ristretto tenendo conto che nella maggior parte dei casi l’allergia al latte si risolve oltre i 5 anni di età. (21)

Un secondo probiotico al quale si assegna un ruolo protettivo nella sensibilizzazione alle proteine del latte è *Bifidobacterium bifidum* TMC3115, consigliato dalla ricerca di Wei Jing, *et al.*, (2020) (22). Il batterio in questione è stato testato in 256 neonati allergici al latte suddivisi in due gruppi, uno di controllo (128 membri) e l’altro di trattamento con *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 (128 membri). Durante i sei mesi di cura si è notato che questa specie batterica sia in grado di alleviare i sintomi allergici tipici (Figura 18), favorire proprietà antinfiammatorie, aumentando i livelli di IL-10 e diminuendo viceversa TNF- α e altre citochine pro-infiammatorie (Figura 19), inoltre un aspetto significativo, è il fatto che nel gruppo trattato con il probiotico è stata riscontrata una diminuzione di anticorpi IgE (Figura 20).

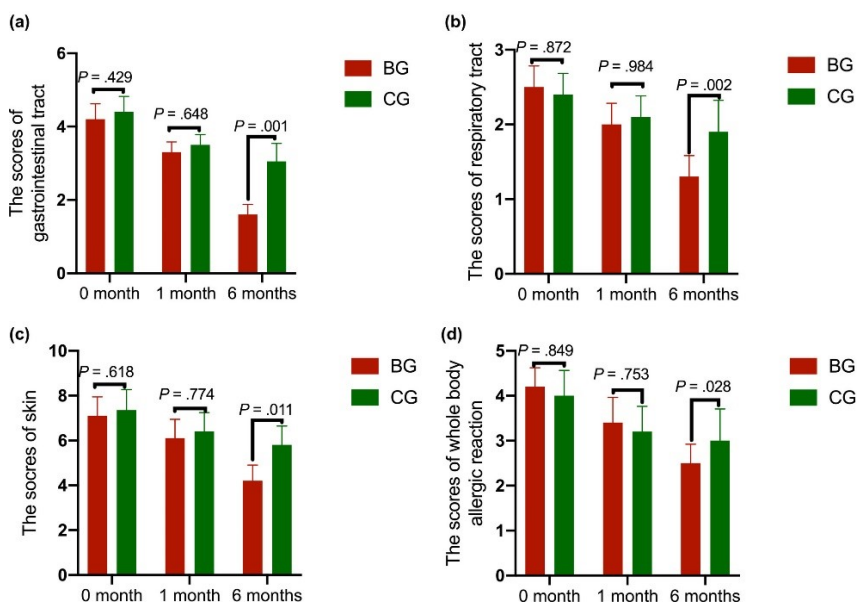


Figura 18. “Il confronto dei punteggi dei sintomi allergici tra due gruppi. (a) I punteggi del tratto gastrointestinale. (b) I punteggi delle vie respiratorie. (c) I punteggi della pelle. (d) I punteggi della reazione allergica di tutto il corpo.” (22)

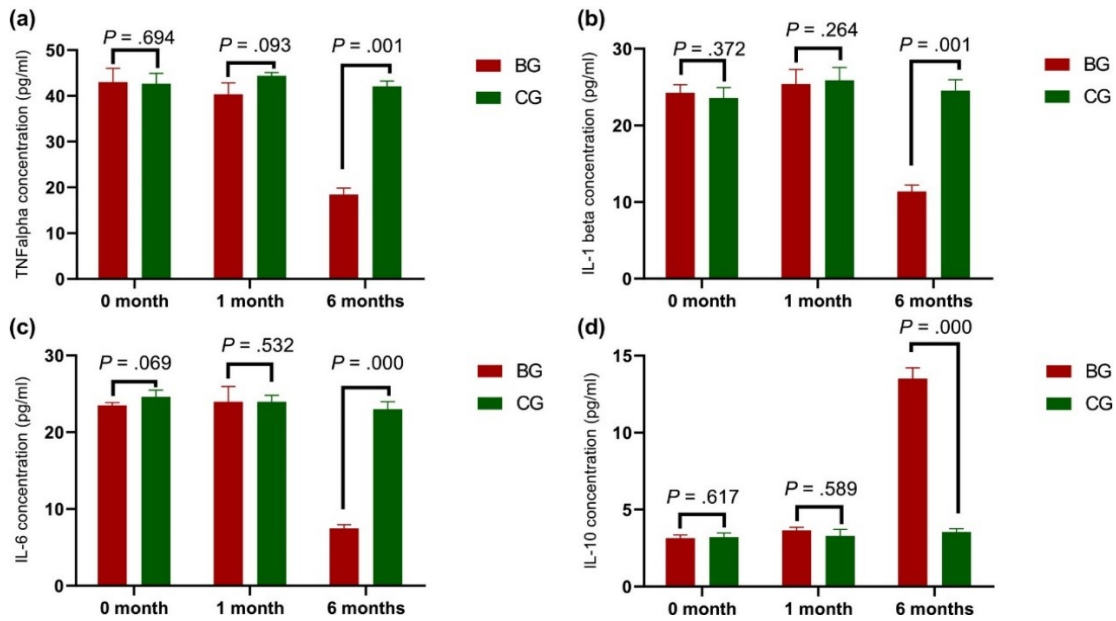


Figura 19. “Gli effetti del *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 sui livelli sierici delle citochine infiammatorie. (a) TNF α . (b) IL-1 β . (c) IL-6. (d) IL-10.” (22)

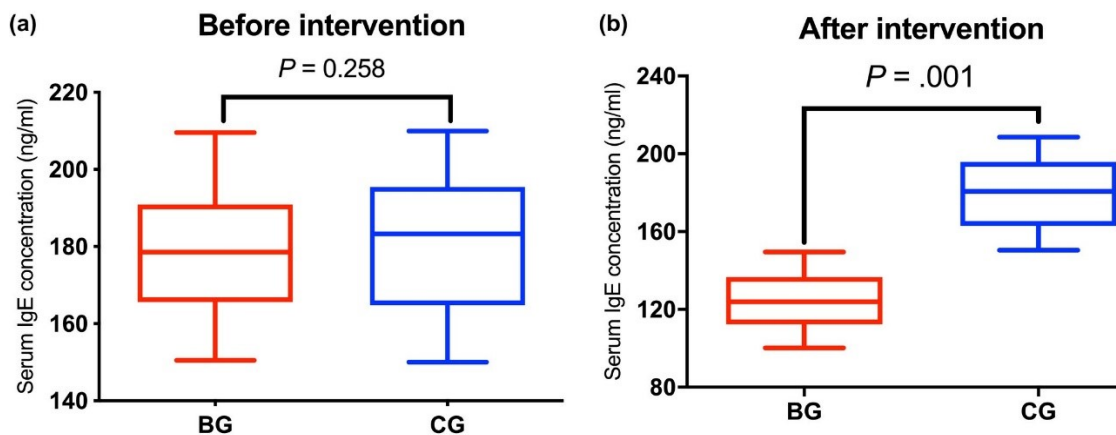


Figura 20. “Gli effetti del *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 sui livelli sierici di IgE nei neonati CMPA. (a) Livelli sierici di IgE prima della terapia. (b) Livelli sierici di IgE dopo la terapia.” (22)

Ulteriormente è stata compiuta l’analisi del microbiota intestinale dei bambini trattati, confrontandolo poi con quello del gruppo di controllo ed è stato riportato che:

“Dopo 6 mesi di intervento, *B. bifidum* TMC3115 ha aumentato la proporzione di genere di *Lactobacillus*, *Alistipes* e *Barnesiella* e ha ridotto la proporzione di *Anaerovibrio*, *Christensenellaceae*, *Oscillibacter*, *Bilophila*, *Dorea* e *Roseburia* rispetto al gruppo CG” (22)

Tutto ciò suggerisce che la somministrazione del probiotico *B. bifidum* TMC3115 possa migliorare la composizione del microbiota intestinale associato ad una maggiore tolleranza alle proteine del latte. (22)

2.2.2 Probiotici nell'allergia alle uova

Tutti gli studi che supportano l'uso di determinati probiotici nella cura dell'allergia alle uova sono compiuti su topo, purtroppo non ancora si è a disposizione di sperimentazioni su uomo a riguardo. Nonostante ciò, alcuni ceppi batterici sembrano essere promettenti nel modificare positivamente il microbiota intestinale e nell'alleviare i sintomi allergici stimolando una maggiore tolleranza.

Na li, *et al.* (2020) ⁽²³⁾ hanno indotto allergia con 20 µg di ovalbumina (OVA) in modelli murini, successivamente si sono costituiti tre gruppi: uno di controllo (Control), un secondo sensibilizzato da OVA (OVA) e un terzo sempre allergico a OVA, ma trattato con *Bifidobacterium breve M-16V* (OVA +Bb). Durante la ricerca si è potuto notare l'utilità di questo ceppo batterico nell'allergia alimentare. *B. breve* riduce notevolmente l'infiammazione causata dallo stato allergico a livello intestinale, inibisce la produzione di alcune citochine indotte da OVA, ovvero IL-4 e IFN-γ. Inoltre, un aspetto cruciale dello studio, è stato identificato in IL-33, in grado di stimolare la generazione delle cellule T2 che, come si è riportato spesso, stanno alla base della costituzione delle allergie alimentari. Il gruppo OVA+Bb ha ricevuto una inibizione considerevole di IL-33 rispetto al gruppo non trattato (Figura 21) e ciò si è tradotto anche con una minore insorgenza di sintomi allergici.

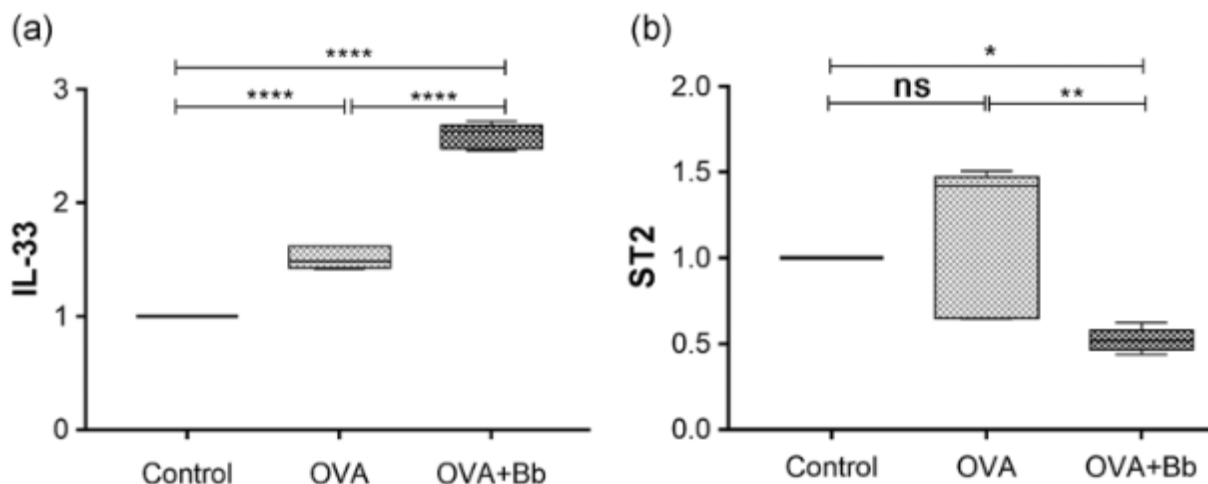


Figura 21. “Effetto del trattamento orale di Bb M16V sull’espressione di IL33 e ST2 in un modello murino mediante Qpcr. (a) espressione di IL33 nell’intestino tenue. (b) espressione di ST2 nell’intestino tenue.” ⁽²³⁾

Successivamente gli esperti sono andati ad analizzare le differenze compositive del microbiota intestinale tra il gruppo OVA+Bb e quello trattato solo con OVA per individuare la correlazione positiva che il probiotico svolge. In sintesi il gruppo OVA Bb ha avuto una riduzione elevata di *Epsilonproteobacteria* e *Campylobacterales*, responsabili dell’aumento di IL-4 e IFN-γ e al contrario il gruppo OVA era arricchito in *Bacteroides* connessi con una maggiore induzione di IL-33. ⁽²³⁾

Un altro articolo interessante di Duan C, *et al.*, (2022) ⁽²⁴⁾ testa un secondo probiotico che si rivela utile in caso di allergia alimentare da OVA, si tratta di *Lactobacillus plantarum* JC7.

Lo studio prende in considerazione tre gruppi di topi trattati in modo differente: ad alcuni viene somministrata una quantità pari a 20 µg di ovalbumina da mettere in confronto con il gruppo al quale viene somministrato il probiotico *L. plantarum* JC7 e infine quello placebo (soluzione

fisiologica allo 0,9%). La ricerca è durata tre mesi nei quali si sono verificati i seguenti risultati: il probiotico ha ridotto i livelli di IgE specifiche per OVA e di istamina plasmatica, anche i valori delle citochine sono variati con un aumento di IL-10 (attività immunosoppressiva) e riduzione di IL-4 e IL-17A e infine si è notato un ripristino dell'equilibrio tra T_H1/T_H2 e la stimolazione di cellule T regolatorie. Tutto ciò ovviamente ha collaborato in una risoluzione dei sintomi allergici nel gruppo trattato con *L. plantarum* JC7 rispetto a quelli solo con OVA. ⁽²⁴⁾

In seguito si prende in considerazione un recente studio di Wenwei Lu, *et al.*, (2022) ⁽²⁵⁾ che testa sempre su topo sei ceppi probiotici: *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1189, *L. reuteri* CCFM1190, *Bifidobacterium longum* CCFM1029, HeNJZ8M1, *L. plantarum* CCFM11 e *L. reuteri* CCFM1072. I modelli murini, allergici a OVA, sono stati suddivisi in otto gruppi, uno per ogni ceppo probiotico, per un totale di sei gruppi, e infine gli altri due comprendono quello di controllo e quello senza alcun trattamento (formati da sei topi ognuno).

Valutando direttamente i risultati si viene a conoscenza che tre dei batteri provati danno una svolta nell'allergia all'uovo, si tratta di *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1189, *L. reuteri* CCFM1190, *Bifidobacterium longum* CCFM1029. Ciò lo si può notare nei grafici sottostanti della Figura 22.

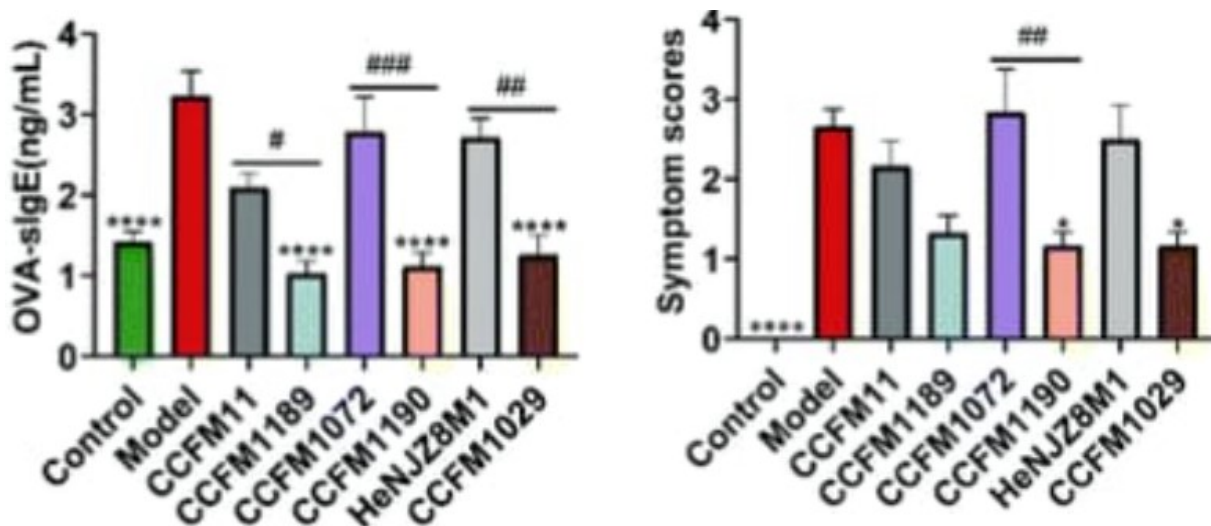


Figura 22. "I sintomi allergici alimentari il giorno 43 e il livello di siero OVA-sIgE nei topi." ⁽²⁵⁾

I tre ceppi selezionati hanno dimostrato la diminuzione dei sintomi allergici e dei livelli sierici di IgE specifiche per OVA rispetto agli altri probiotici e ai modelli non trattati.

Per andare più in profondità gli esperti hanno voluto esplorare l'azione di questi ceppi e successivamente si evidenzia questo riscontro:

"*L. plantarum* CCFM1189 e *L. reuteri* CCFM1190 hanno ridotto significativamente i livelli di IL-4, IL-5 e IL-13, mentre *B. longum* CCFM1029 non ha avuto alcun effetto significativo sull'attenuazione dei livelli di IL-5 e IL-13. *L. plantarum* CCFM1189 e *B. longum* CCFM1029 hanno ridotto i livelli di IL-17 e *L. reuteri* CCFM1190 non ha avuto effetti significativi. Gli altri ceppi dello stesso genere non hanno avuto alcun effetto sull'attenuazione di IL-4, IL-5 e IL-13, ad eccezione di CCFM1072, che ha ridotto i livelli di IL-4. C'erano effetti specie e ceppo-specifici sulla regolazione della risposta immunitaria Th2 e Th17." ⁽²⁵⁾

Sono stati analizzati anche i profili della composizione microbica, risultando che i tre probiotici antiallergici abbiano aumentato la ricchezza del microbiota intestinale nei topi trattati. Per dare un'idea, nella figura 23 è presente una panoramica della distribuzione microbica tra i vari gruppi messi a confronto.

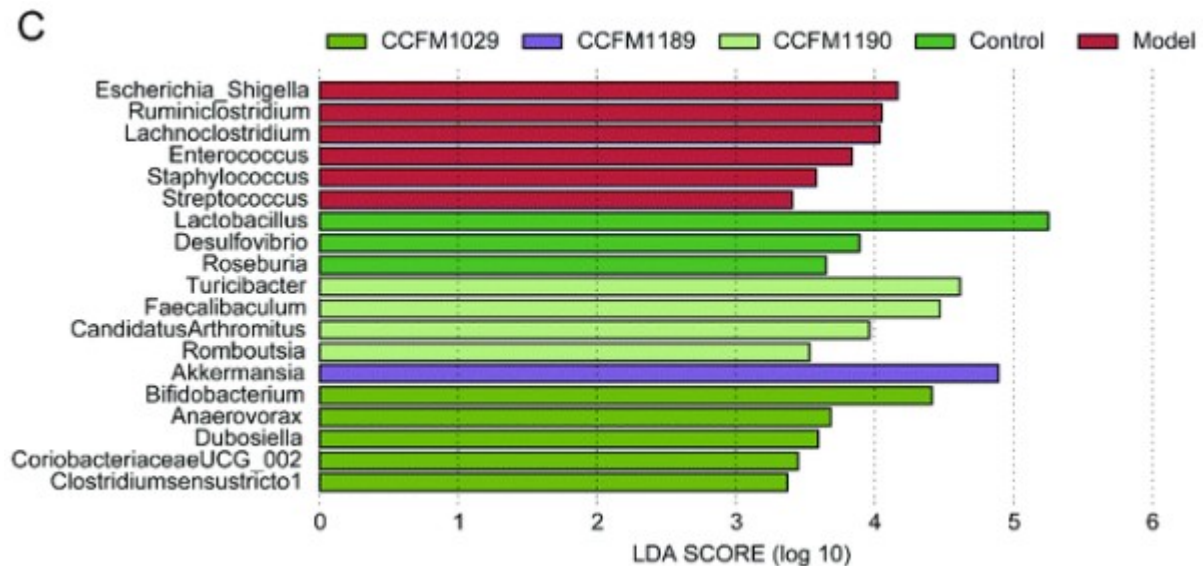


Figura 23. “Analisi LEfSe delle alterazioni microbiche intestinali tra il controllo, il modello e i gruppi di ceppi probiotici efficaci (gruppi CCFM1189, CCFM1190 e CCFM1029). L’abbondanza di *Akkermansia* è più alta nel gruppo CCFM1189 rispetto agli altri gruppi. CCFM1190 ha arricchito *Turicibacter*, *Faecalibaculum*, *Candidatus arthromitus* e *Romboutsia* rispetto agli altri gruppi. CCFM1190 ha arricchito *Turicibacter*, *Faecalibaculum*, *Candidatus arthromitus* e *Romboutsia* rispetto agli altri gruppi. CCFM1029 ha arricchito *Bifidobacterium*, *Anaerovorax*, *Dubosiella*, *Coriobacteriaceae UCG-002* e *Clostridium sensu stricto*.⁽²⁵⁾

Inoltre lo stesso studio esegue delle analisi nei campioni fecali dei metaboliti intestinali prodotti, da ciò viene correlato un derivato del triptofano, l’acido indoleacrilico, con le specie *L. plantarum* CCFM1189 e *L. reuteri* CCFM1190. Alcune ricerche evidenziano che l’acido indoleacrilico, attivando l’AhR, aumenti la secrezione di IL-22 che a sua volta migliora l’integrità della barriera intestinale e inibisce le citochine IL-5 e IL-13 che andrebbero a stimolare i linfociti T_H2.⁽²⁵⁾

Il prossimo articolo che approfondisce questo tema è stato redatto da Shin HS, *et al.*, (2018)⁽²⁶⁾. In quest’ultimo caso viene sperimentata una miscela, definita P5, di probiotici in topi con allergia indotta da OVA. I ceppi in questione riguardano: *Lactococcus lactis* KF140, *Pediococcus pentosaceus* KF159, *Lactobacillus pentosus* KF340, *Lactobacillus paracasei* 698 e *Bacillus amyloliquefaciens* 26N. Come sempre sono stati suddivisi i modelli murini casualmente in tre gruppi messi poi a confronto: i controlli (naive), i non trattati (Sham) e infine quelli trattati con P5 (P5). Si è potuto notare che la miscela abbia ridotto in modo significativo i sintomi tipici allergici, tra cui la reazione anafilattica. Inoltre P5 ha diminuito il livello di IgE sia totali che specifiche per OVA (Figura 24) e ripristinato il rapporto T_H1/T_H2.

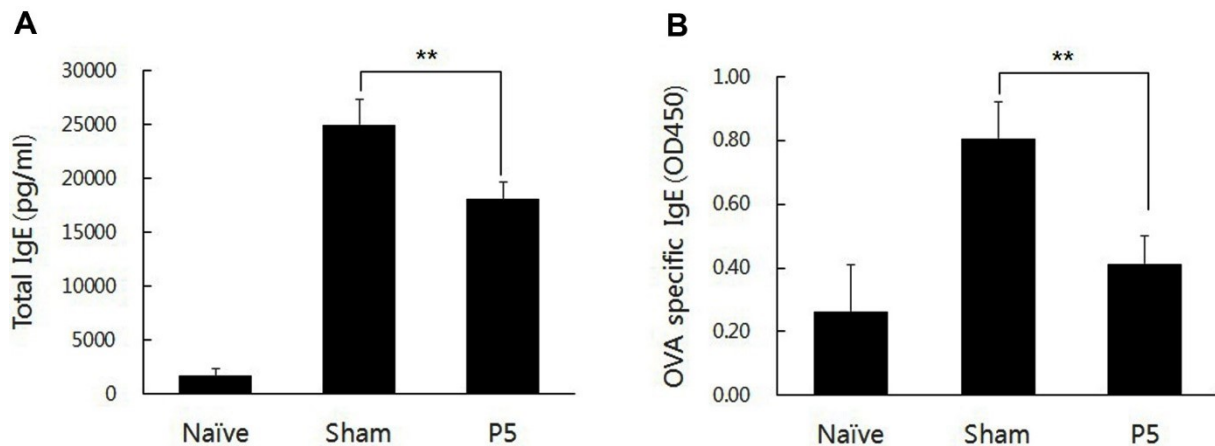


Figura 24. “Effetti della miscela probiotica (P5) sulla produzione di IgE totali (A) e IgE specifiche per OVA (B) nel siero di topi con allergia alimentare indotta da OVA.”⁽²⁶⁾

Dopo questi risultati gli esperti hanno voluto andare più in profondità nella questione e capire da cosa questi effetti antiallergici fossero correlati, infatti gli autori esprimono:

“Negli splenociti restimolati con OVA, tutte le citochine correlate a Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) hanno mostrato livelli aumentati in seguito all'induzione di allergia alimentare e sono state significativamente inibite dalla somministrazione di P5. Al contrario, le citochine correlate a Th1 (IFN- γ , IL-12) erano significativamente aumentate nel gruppo trattato con P5 rispetto a quelle del gruppo sham. Abbiamo anche studiato il ruolo di IL-17, una citochina correlata a Th17, nell'allergia alimentare. È stato riscontrato che la secrezione di IL-17 aumenta in seguito all'induzione di allergia alimentare ed è stata significativamente soppressa dalla somministrazione di P5”⁽²⁶⁾

Successivamente lo studio conferma anche che sia stato l'aumento delle cellule Treg a sopprimere la risposta T_H2, perché nel gruppo P5 si è notato un loro notevole incremento rispetto al gruppo non trattato.⁽²⁶⁾

2.2.3 Probiotici nell'allergia alla tropomiosina dei gamberetti

Nel caso dell'allergia alla tropomiosina dei gamberetti, in letteratura, sono stati trovati solamente due studi di applicazione di determinati probiotici ed entrambi svolti su modelli murini, nonostante ciò i risultati sembrano promettenti e per questo in futuro sarà molto probabile la continua ricerca a riguardo.

Il primo articolo è quello di Fu L., *et al*, (2017)⁽²⁷⁾ il quale prende in considerazione il probiotico *Bifidobacterium infantis* (Binf) nel ripristino dell'allergia alimentare indotta da tropomiosina (Tm). I topi sono stati divisi in due gruppi, in entrambi, gli animali vengono trattati con il probiotico Binf, solo che in un caso viene fatto assumere in modo preventivo (prima dell'allergia) e nell'altro invece dopo l'induzione dell'allergia a Tm (modalità terapeutica); ovviamente sono stati anche effettuati i gruppi di controllo. Inizialmente rispetto ai controlli, i topi sensibilizzati con tropomiosina hanno mostrato alti livelli di istamina sierica, IgE specifiche per Tm, IgG2a e IgG1. Alla fine della sperimentazione i parametri elencati nelle righe precedenti sono diminuiti notevolmente in entrambe i gruppi trattati con Binf rispetto a

quelli non esposti al probiotico, ad eccezione di IgG2a e IgG1 che non hanno mostrato differenze significative. Da questi risultati gli esperti affermano:

“Poiché la produzione di istamina e IgE specifiche sono tipiche risposte allergiche, questi risultati hanno indicato che la somministrazione orale di Binf sopprime l'allergia indotta da Tm sia in modo preventivo che terapeutico.” (27)

Lo stesso studio valuta anche in vitro, nel linfonodo mesenterico e nella milza dei topi, le potenzialità di Binf sulle cellule del sistema immunitario ed evidenzia che il probiotico induca una maggiore concentrazione di cellule T regolatorie sia in modalità terapeutica che preventiva e diminuisca le TH2 dopo il trattamento. Inoltre valutando il rapporto TH2/Treg si esamina che nel gruppo al quale viene somministrato Binf dopo stimolazione a Tm, questo si riduca, mentre al contrario in quelli non trattati, raggiunge e si mantiene a livelli elevati. (Figura 25)

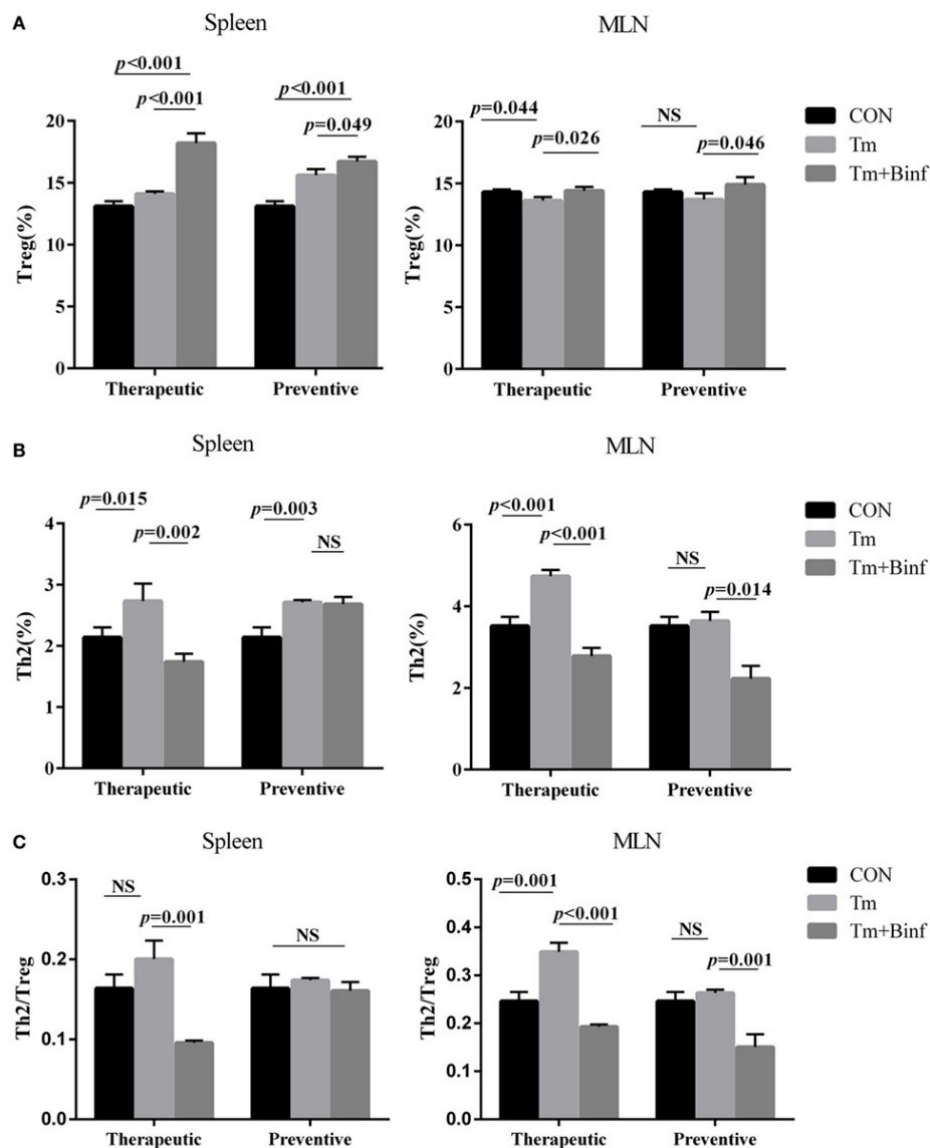


Figura 25. “Binf modula la proporzione di Th2 e delle cellule Treg nel linfonodo mesenterico (MLN) e nella milza. Sono state misurate le percentuali di $CD4^+ CD25^+ CD127^{(basso)}/Treg$ (A) e $CD4^+ CD69^+ ST2 Th2$ (B) nell'intera popolazione di cellule $CD4^+$ T da MLN o milza ($n = 5$) e sono stati misurati i rapporti di Th2 e Treg (C). (27)

Dalle analisi del microbiota intestinale sembra che Binf abbia modulato positivamente la composizione batterica correlata a un miglioramento del rapporto $T_H2/Treg$. Più precisamente la specie *Dorea* che si è vista promuovere Treg (diminuisce il rapporto), è stata aumentata nei topi trattati, mentre al contrario *Ralstonia*, che favorisce le cellule T_H2 , è stata ridotta. ⁽²⁷⁾

Il secondo studio approfondito nella tesi per questa allergia è stato compiuto nel 2019 da Linglin Fu, *et al.* ⁽²⁸⁾ Essi hanno posto attenzione ai probiotici contenuti nello yogurt, ovvero *Bifidobacterium longum* (Bi) e *Bacillus coagulans* (Bc) nel potenziale ripristino dell'allergia a tropomiosina di gamberetti indotta nei topi. Inizialmente sono stati composti un totale di 10 gruppi composti da 6 modelli murini ognuno, 5 formati da topi maschi e 5 da topi femmina. Nel corso della sperimentazione si sono mantenuti solamente i gruppi femminili perché quelli maschili avevano presentato sintomi allergici non significativi alla sensibilizzazione con tropomiosina (Tm). Il primo gruppo viene definito Ctrl, si tratta di topi ai quali viene somministrato 200 μ L di PBS sterile (placebo), nel secondo, ovvero il gruppo Ad, fanno parte topi che hanno assunto 200 μ L di adiuvante di Freund (miscela che stimola le cellule del sistema immunitario) emulsionato con PBS, i rimanenti tre gruppi a loro volta erano rappresentati da modelli murini sensibilizzati con tropomiosina che rispettivamente vengono definiti gruppo Tm, gruppo Bi (trattati con *Bifidobacterium longum*) e infine gruppo Bc (trattati con *Bacillus coagulans*). Nel corso dello studio i topi presentavano le condizioni indicate dalla figura 26, ovvero gli animali trattati con i probiotici hanno avuto una risoluzione significativa della perdita di peso corporeo, e diminuito le reazioni anafilattiche e la concentrazione di istamina, fattori e sintomi che si differenziano di molto dai topi Tm.

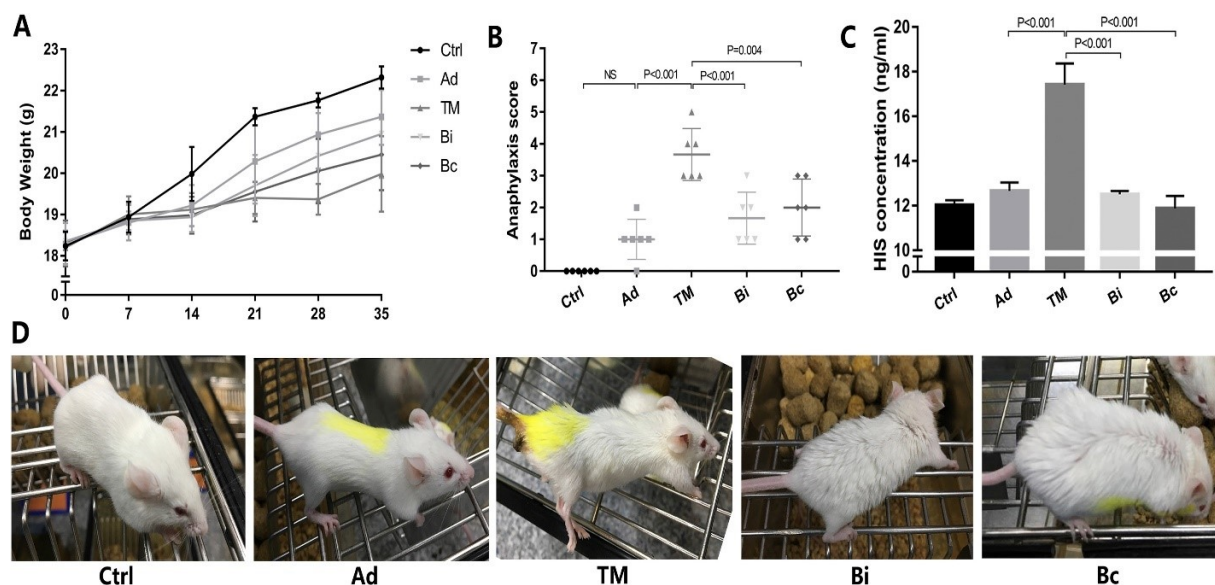


Figura 26. “(A) Variazioni del peso corporeo dei topi Balb/c femmina in ciascun gruppo. (B) I sintomi dell’anafilassi clinica. (C) Le concentrazioni sieriche di istamina. (D) La comparsa di topi Balb/c femmina in ciascun gruppo.” ⁽²⁸⁾

Gli esperti hanno evidenziato che Bi e Bc siano in grado di migliorare l’istologia della mucosa intestinale che durante le reazioni allergiche viene ad essere colpita negativamente. Sono andati ad analizzare il tratto digestivo in tutte le sue parti (duodeno, digiuno, ileo e colon) riferendo che i topi Tm, rispetto a quelli trattati con i probiotici, mostrassero un’istopatologia più grave: si evidenziano una maggiore infiltrazione di cellule pro-infiammatorie (mastociti ed eosinofili), un’iperproliferazione delle cellule caliciformi e l’apoptosi delle cellule della cripta. Come già

anticipato, tutti questi sintomi vengono ad essere ripristinati dai probiotici Bi e Bc. Nella figura 27 si possono notare le immagini istologiche della mucosa intestinale che caratterizza i vari gruppi nel corso dello studio.

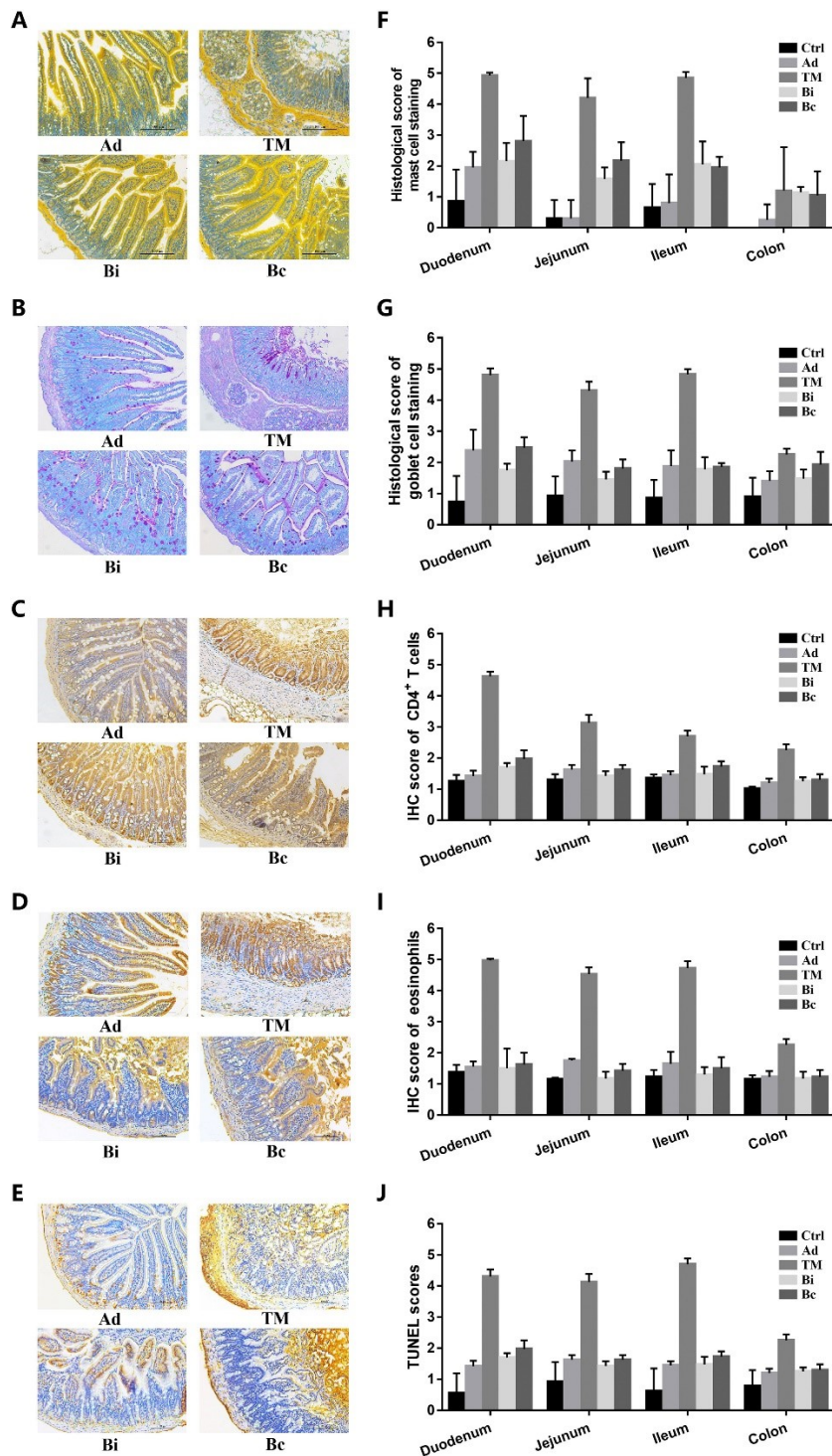


Figura 27. “L'integrazione di Bi e Bc ha alleviato i disturbi della mucosa allergica indotti dalla MT. L'analisi istologica è stata eseguita con sezioni intestinali del duodeno, digiuno, ileo e colon di ciascun gruppo di topi. (A, F) I mastociti sono stati rilevati con un kit di colorazione AS-D cloroacetato esterasi. (B, G) Le cellule caliciformi sono state rilevate da un kit di Schiff acido periodico. (C, H) Le cellule T CD4 + sono state rilevate mediante immunohistochimica. (D, I) Gli eosinofili sono stati rilevati mediante immunohistochimica. (E, J) Le cellule apoptotiche sono state rilevate dal saggio TUNEL. Le sezioni di intestino colorato sono state fotografate con un microscopio Leica a ingrandimento $\times 200$. (28)

Per quanto riguarda le azioni che questi probiotici dello yogurt svolgono, si è valutato il profilo delle cellule T caratterizzante ogni gruppo e si è messo in risalto la potenzialità antiallergica dei due ceppi probiotici. Ovviamente i topi Tm dimostrano livelli elevati di IgE e IgG2a specifiche per tropomiosina, valori che in topi con somministrazione probiotica risultano ridotti. Successivamente si sono coltivate in vitro le cellule spleniche isolate dai topi per descrivere le citochine prodotte. Il gruppo Bi produce una quantità significativa di IL-10 e IFN- γ , che rispettivamente stimolano le cellule Treg e T_H1, e valori ridotti di IL-4 che andrebbe a stimolare la tipologia cellulare scatenante il processo allergico, ovvero T_H2. Mentre il gruppo Bc, da una parte, si è visto aumentare le IL-17A pro-infiammatorie, dall'altra invece media una riduzione di IL-13 che svilupperebbe sempre le cellule T_H2. Nello stesso studio è stata verificata anche la composizione microbica intestinale nei vari modelli e si definisce il fatto che la sensibilizzazione a Tm abbia portato ad una disbiosi con una riduzione del genere *Bacteroides* e un incremento di *Firmicutes*, alterando così il loro equilibrio. Inoltre anche la famiglia delle *Lachnospiraceae*, una delle più abbondanti nel microbiota intestinale, è stata diminuita in termini quantitativi in topi Tm; si ricorda che quest'ultima è associata ad elevata produzione di butirrato, un metabolita in grado di indurre tolleranza. Dalle successive analisi si può definire che Bi e Bc siano in grado di mantenere e ripristinare l'omeostasi microbica intestinale, andando a loro volta ad aumentare i *Bacteroides* e ridurre i *Firmicutes*, anche *Lachnospiraceae* è stata ricostituita. ⁽²⁸⁾

3. Estratti vegetali nelle allergie alimentari

Oltre ai vari probiotici definiti nel capitolo 2, anche gli estratti vegetali trovano largo spazio in letteratura nel ripristino delle allergie alimentari. Nonostante tutti gli studi finora effettuati a riguardo siano esclusivamente su topo, determinati botanicals sembrano essere promettenti per tutte le persone ipersensibili agli alimenti.

Si anticipa il fatto che, gli articoli su specifici estratti vegetali come potenziali antiallergici, siano molto meno frequenti rispetto a quelli che trattano di probiotici visti nei capitoli precedenti, questo si evidenzia non di certo per togliere importanza ad essi, ma per dare un'idea che ci sia ancora tanto da dover sperimentare. Oltretutto potrebbe essere una buona soluzione mettere in associazione ciò che deriva dal mondo vegetale con quello dei probiotici, in questo modo potrebbe crearsi una sinergia positiva tra i due, dando buoni risultati.

Nei prossimi sottocapitoli si determinano i materiali e i metodi utilizzati nella ricerca, per poi susseguirsi nell'approfondimento dei vari estratti vegetali promettenti nei casi di ipersensibilità agli alimenti.

3.1 Materiali e metodi utilizzati nella ricerca degli studi analizzati

Il motore di ricerca utilizzato per trovare i seguenti articoli è stato “*PubMed*” nel quale sono state inserite le seguenti parole chiave per avere risultati attinenti alla tematica: “*Herbal extracts in food allergies*”, “*The use of botanicals in food allergies*” e per ultimo “*The combination of probiotics and plant extracts in food allergies*”.

Innanzitutto si parte con il dire che in letteratura non sono stati trovati studi sull'associazione di probiotici ed estratti vegetali nel ripristino delle allergie alimentari, ma solamente presi in considerazione singolarmente. Inoltre, come già accennato, non esiste ancora nulla di dimostrato su uomo, infatti si evidenziano solamente sperimentazioni su modelli murini.

In totale sono risultati 12 studi, di cui 4 sono stati subito eliminati, perché trattavano di una formula composta da 3 piante vegetali cinesi nell'ambito dell'allergia alle arachidi, alimento non approfondito nella tesi. I restanti 8 articoli sono basati per la maggior parte sull'allergia a OVA, più precisamente 7 su di essa e uno solamente su tropomiosina di gamberetti. Purtroppo per l'allergia al latte non è stato ancora sperimentato nulla, motivo per cui non verrà ad essere presa in considerazione nei prossimi sottocapitoli.

Come nel caso dei probiotici, è stata allestita una semplice tabella che riportava gli studi divisi per allergia trattata e per estratto vegetale impiegato, delineando in questo modo per l'allergia a OVA la specie *Scutellaria baicalensis* (1 studio), resveratrolo (1 studio), curcumina (2 studi), licopene (1 studio), quercetina (1 studio), L-teanina ed epigallocatechina gallato (1 studio), mentre per tropomiosina è stato testato epigallocatechina gallato in associazione però con acido clorogenico (1 studio).

Successivamente è stato deciso di suddividere i prossimi sottocapitoli, non per allergia alimentare come è stato fatto nel capitolo 2, ma per estratto vegetale, essendo che per l'ipersensibilità alle proteine del latte non è stato trovato nulla e per tropomiosina solamente un unico articolo.

3.2 *Scutellaria baicalensis* L. nell'allergia alle uova

La radice di *Scutellaria baicalensis* L. viene utilizzata tradizionalmente nella medicina cinese, a questa specie vengono riconosciute varie attività elencate da “Il giornale di farmacia e farmacologia”⁽²⁹⁾ (2019):

“Scutellaria baicalensis è usata per curare malattie come diarrea, dissenteria, ipertensione, emorragie, insonnia, infiammazioni e infezioni respiratorie. Attualmente, nella moderna ricerca clinica, S. baicalensis è comunemente usata per trattare malattie come epatite da tracoma, ipertensione, infezione respiratoria acuta, gastroenterite acuta, diarrea infantile, vomito durante la gravidanza e altre malattie.”⁽²⁹⁾

I flavonoidi di questa pianta e i loro glicosidi, come baicalina, baicaleina, wogonoside e wogonina, giocano un grosso ruolo negli effetti positivi sopra elencati, inoltre sono stati riconosciuti responsabili anche di un'attività sul sistema immunitario antiallergica.⁽²⁹⁾

Più precisamente Kim, *et al.*, (2010)⁽³⁰⁾ dimostrano in vivo la potenziale diminuzione di rilascio di istamina e leucotrieni associati al legame anti-OVA e mastociti da parte di baicalina.⁽³⁰⁾

Un terzo studio a supporto, di Bui., *et al.*, (2017)⁽³¹⁾, conferma che, in topi ai quali è stata indotta allergia a OVA, l'estratto etanolicco di *S. baicalensis*, in particolare baicaleina e wogonina in esso contenuti, sia in grado di ripristinare lo squilibrio T_H1/T_H2, ridurre il numero di eosinofili e i livelli di IL-4, IL-5 e IgE specifiche per OVA.⁽³¹⁾ (Figura 28)

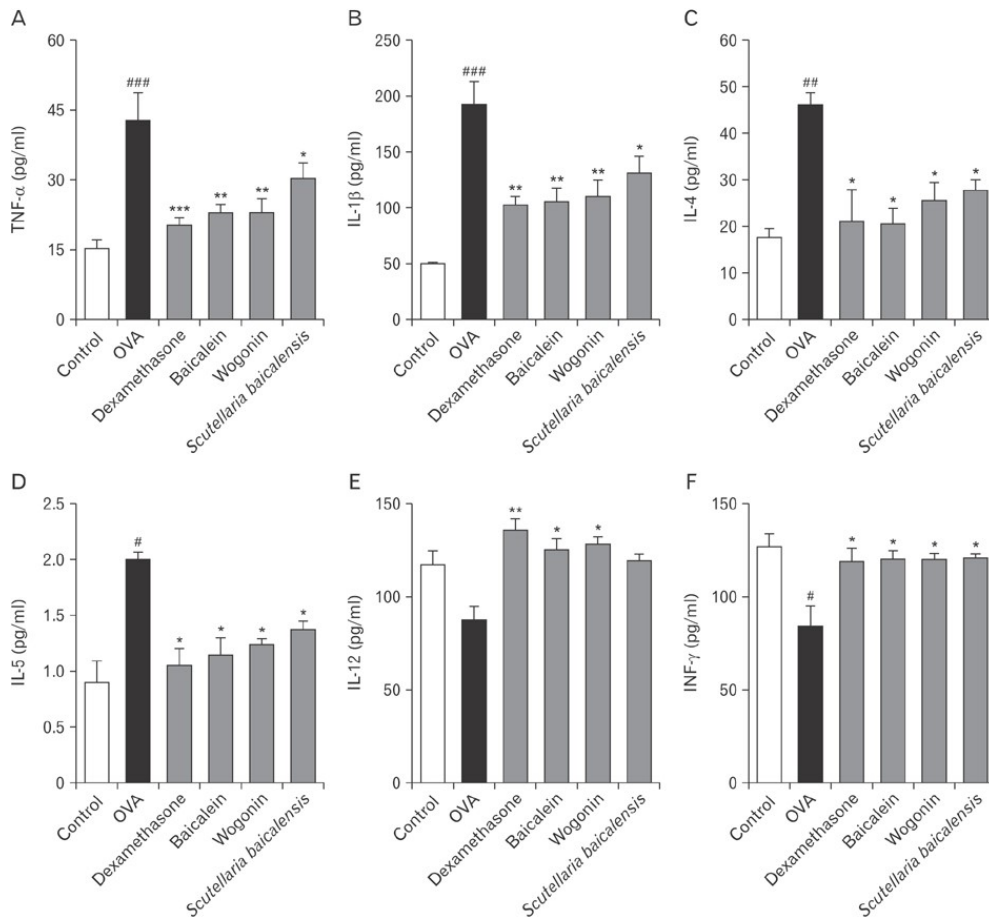


Figura 28. “Effetto di baicalein, wogonin ed estratto di etanolo di *Scutellaria baicalensis* sui livelli di citochine Th1/Th2 nel fluido di lavaggio broncoalveolare. (A) Fattore di necrosi tumorale α (TNF- α). (B) Interleuchina (IL)-1 β . (C) IL-4. (D) IL-5. (E) IL-12. (F) Interferone γ (IFN- γ).⁽³¹⁾

L’ultimo studio riguardo l’utilizzo di *S. baicalensis* è quello di Shin HS, *et al.*, (2014)⁽³²⁾. Gli autori hanno suddiviso in tre diversi gruppi i topi BALB/c: il controllo “naïve” (n = 5), quelli sensibilizzati con OVA “sham” (n = 9) e infine skullcap, ovvero topi sempre allergici a OVA, ma trattati con l’estratto di *S. baicalensis* (n = 9). Innanzitutto sono stati utilizzati 20 μ g di OVA per indurre allergia, mentre per quanto riguarda la quantità di estratto vegetale 25 mg/kg sono stati somministrati ogni giorno dal diciassettesimo al trentaquattresimo. Nel corso della sperimentazione sono stati valutati i sintomi allergici tipici, in particolare diarrea e reazione anafilattica. Come esposto nei grafici della figura 29, *S. baicalensis* ha dato buoni risultati nella soppressione dell’anafilassi rispetto al gruppo sham, mentre i sintomi diarroici non sono stati particolarmente alleviati dall’estratto, infatti i due punti nel grafico A sono molto vicini tra loro.

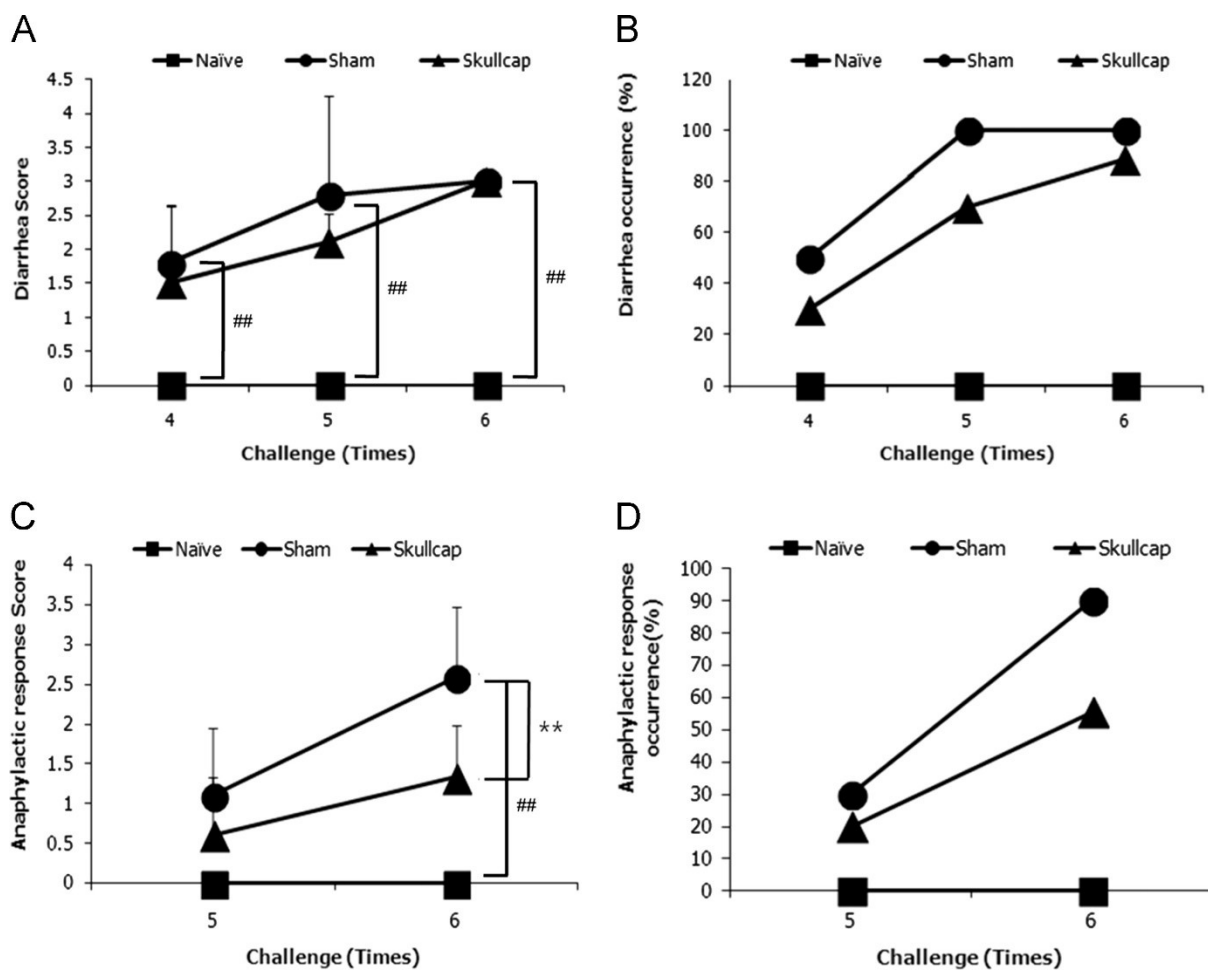


Figura 29. “Effect of skullcap on OVA-induced diarrhea and anaphylactic response. Food allergy symptoms induced by OVA were evaluated and scored by criteria for diarrhea symptoms and anaphylactic response for 1 h after challenge with OVA. Diarrhea score (A) and diarrhea occurrence (%) (B) were evaluated on the 4th, 5th, and 6th challenges. Anaphylactic response score (C) and anaphylactic response occurrence (%) were also evaluated on the 5th and 6th challenges.”⁽³²⁾

Oltre a ciò, si riconosce anche l’inibizione sia di IgE totali sia specifiche per OVA nel gruppo skullcap. È stata presa in considerazione anche la produzione di citochine negli splenociti isolati dei topi e, ricordando che IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e IL-13 sono correlate ai linfociti T_H2 e IFN- γ e IL-12 ai T_H1, il gruppo skullcap rispetto a sham ha visto un calo delle prime e un aumento delle seconde, ripristinando lo squilibrio tra i due tipi di cellule T e aumentando la tolleranza a OVA.⁽³²⁾ (Figura 30)

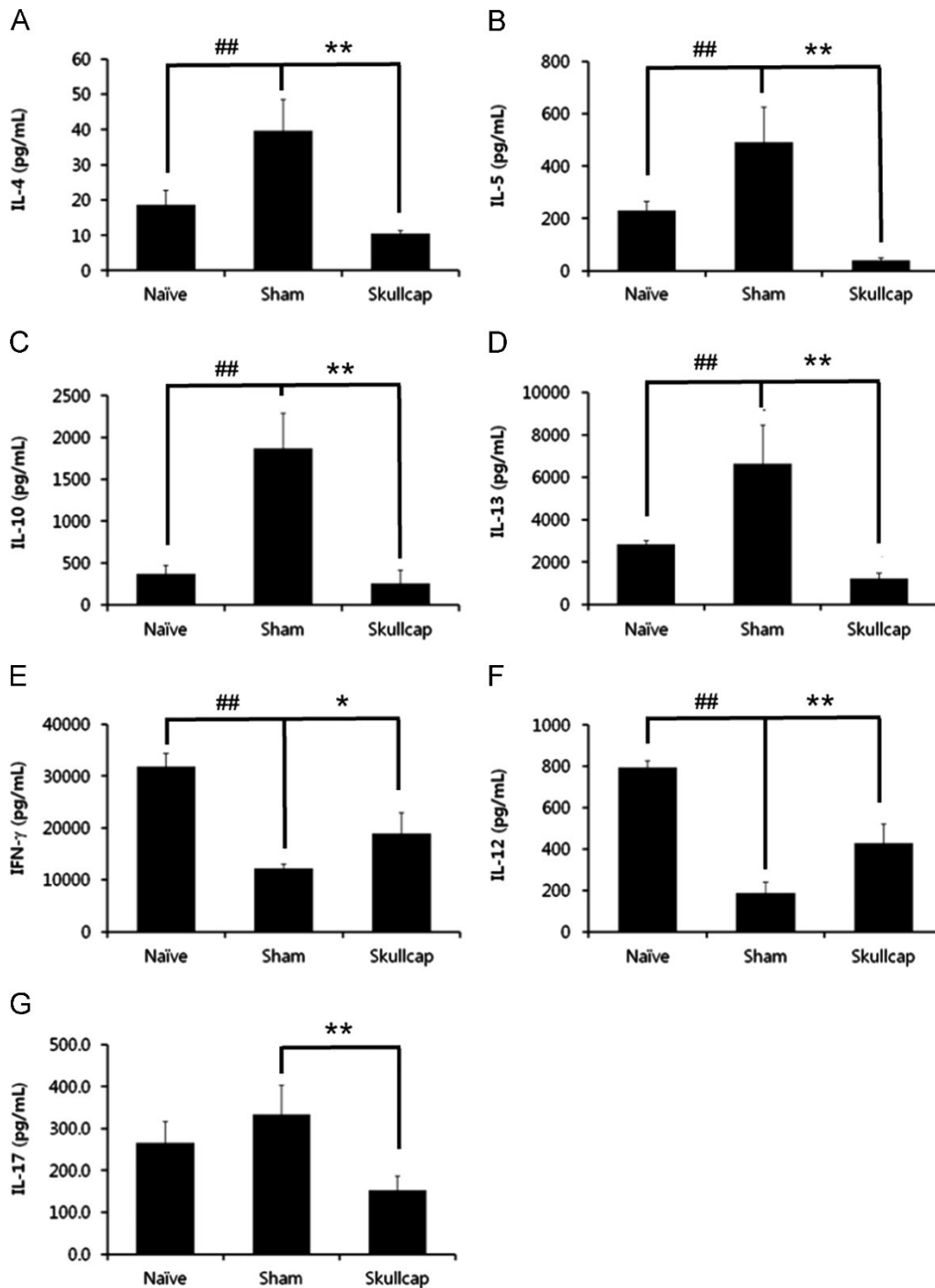


Figure 30. “Immunomodulatory effects of skullcap on cytokine patterns in splenocytes. Mice were sacrificed by cervical dislocation on day 35, and spleens were removed. Splenocytes were isolated from the spleen and cultured in RPMI medium containing 10% FBS for 72 h. Cytokines secreted from splenocytes were measured by ELISA. IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C), and IL-13 (D) were measured as Th2 cytokines. IFN- γ (E), IL-12 (F) were measured as Th1 cytokines and IL-17 (G) as a Th17 cytokine. ⁽³²⁾

3.3 Il resveratrolo nell'allergia alle uova

Il resveratrolo si trova principalmente nella buccia dell'uva e nel vino rosso, questo polifenolo ha proprietà antifungine all'interno delle piante e, da molti anni ormai, sta alla base di molteplici integratori alimentari ad azione antiossidante e benefica per le patologie cardiovascolari.

Nel 2012 è stato eseguito uno studio su questa molecola se potesse avere dei risultati promettenti anche come sostanza antiallergica, per fare ciò Okada Y, *et al.* ⁽³³⁾ hanno suddiviso in due gruppi modelli murini sensibilizzati a ovalbumina, di cui, a uno di questi, è stato somministrato nella dieta anche resveratrolo (22,4 mg/kg di dieta, 0,01% di resveratrolo). Dopo cinque settimane sono stati sacrificati per le analisi. Ovviamente i topi allergici hanno dimostrato alti livelli sierici di IgE specifiche per OVA, parametro che invece si vede diminuire in modo considerevole nel gruppo trattato con resveratrolo. Anche la misurazione della temperatura rettale è calata nei topi alimentati con il polifenolo. Inoltre dall'analisi in vitro degli splenociti si è potuto notare che il resveratrolo vada ad inibire la differenziazione sia delle cellule T_{H1} sia T_{H2}, agendo sulla riduzione di IFN- α , IL-4 e IL-13 associati a loro volta all'mRNA di T-bet e GATA3 che trascrivono per le due tipologie di linfociti T. Al contrario Foxp3, principale fattore di espressione delle cellule T regolatorie, non ha visto particolari aumenti grazie al resveratrolo, infatti i suoi livelli rimangono per lo più invariati tra i gruppi. Tramite il test WST si può delineare che il resveratrolo non abbia influenzato neanche la vitalità cellulare degli splenociti, questo va ad indicare che l'inibizione della differenziazione delle cellule T non sia avvenuta tramite un'azione di riduzione della vita cellulare generale da parte della molecola. ⁽³³⁾ (Figura 31)

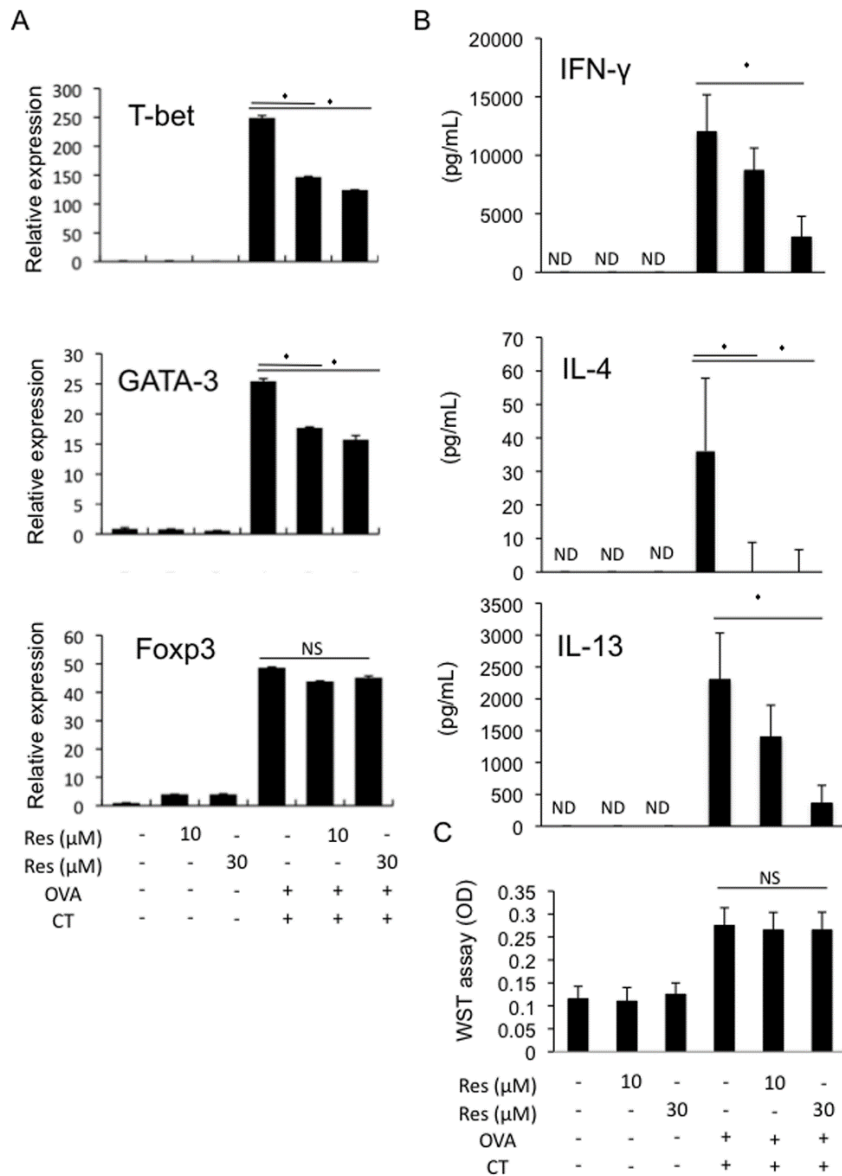


Figure 31. “mice-derived splenocytes were un-stimulated or stimulated with 300 μg/ml OVA plus 12 pM CT (cholera toxin) and were cultured in the presence or absence of 10 or 30 μM resveratrol for the indicated times. Then the analysis described below was performed. A. After 3 day-culture, RNA samples were extracted from the cells and the cDNA samples were synthesized using reverse transcriptase system. Quantitative real-time PCR analysis was then done for T-bet, GATA3, and Foxp3 mRNAs. Relative expression levels are shown (n=3 per group). B. After 3 day-culture, the supernatants were collected and IFN- γ , IL-4, and IL-13 concentrations were measured by ELISA (n=9 per group). C. After 3 day-culture, the cells were subjected to a WST assay for evaluation of the cell viability (n=4 per group). Values represent the mean \pm SD. *P<0.05 in comparison to the corresponding controls. (ND: non-detected).⁽³³⁾

3.4 La curcumina nell'allergia alle uova

La curcumina è una sostanza naturale di origine vegetale che si ricava dal rizoma di *Curcuma longa L.* È un pigmento color giallo-arancio che, oltre ad avere spiccate proprietà antinfiammatorie e antiossidanti, viene utilizzato come colorante alimentare con sigla E100.

In letteratura sono comparsi due studi sull'utilizzo di curcumina nel ripristino dell'allergia alimentare a OVA indotta in modelli murini.

Gli autori del primo articolo, Kinney SR, *et al.*, (2015) ⁽³⁴⁾, rivelano che curcumina possa vantare anche di una potenziale azione antiallergica, questo per lo meno su modello animale. I topi sono stati sensibilizzati con 50 µg di ovalbumina per via intraperitoneale (i.p.) e successivamente con 50 mg di OVA per via intragastrica (i.g.). Per quanto riguarda il gruppo trattato con curcumina, sono stati utilizzati 300 µg in 1% di carbossimetilcellulosa ogni giorno; sono stati previsti come sempre anche i controlli. Come poi sarà dimostrato nella figura 32, il livello di IgE specifiche per OVA diminuisce drasticamente nei modelli trattati con curcumina. La sostanza vegetale si è vista anche ridurre il numero di mastociti intestinali, rispetto all'altro gruppo, questo ha fatto sì che il sintomo di diarrea si riducesse di molto.

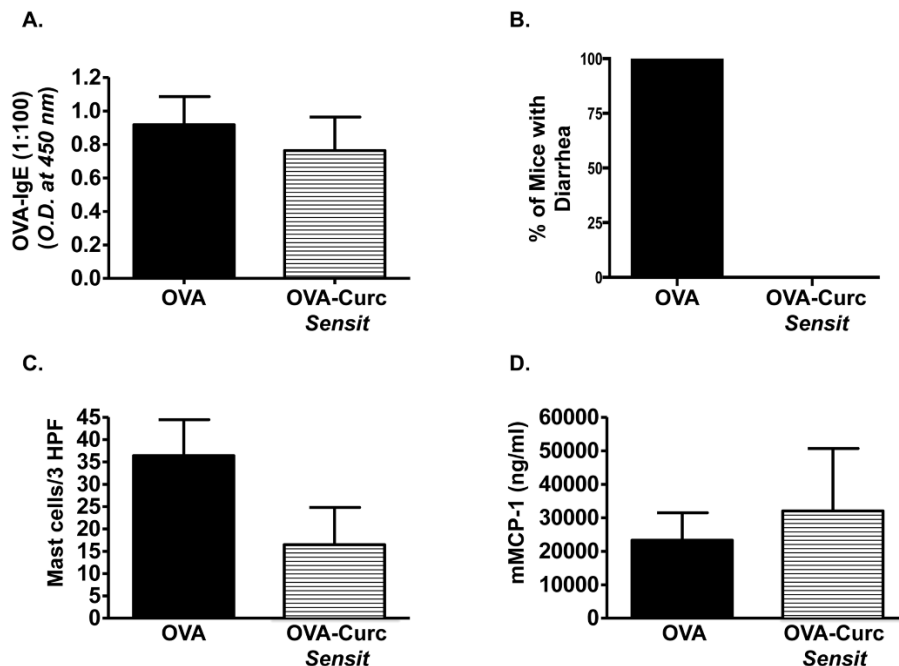


Figura 32. “(A) Levels of serum OVA-IgE (1:100 dilution of serum was used for the assay); (B) Percent of mice with diarrhea; (C) Numbers of CAE+ mast cells; (D) and serum mMCP-1 (mouse Mast Cell Protease) levels are shown. ⁽³⁴⁾”

I prossimi grafici (Figura 33) invece, vanno a sintetizzare i livelli di citochine associate alle cellule TH2, ovvero IL-4, IL-13, IL-5, IL-9, IL-33, IL-10, IL-17 e IFN-γ, prodotte nei modelli allergici a OVA. È interessante notare che curcumina abbia ridotto tutte le interleuchine sopra citate, tranne IL-33 e IFN-γ la quale concentrazione non è stata influenzata notevolmente. Per quanto riguarda IL-17, durante la sfida con OVA, era diminuita e dopo la somministrazione di curcumina non ha mostrato cambiamenti in termini quantitativi.

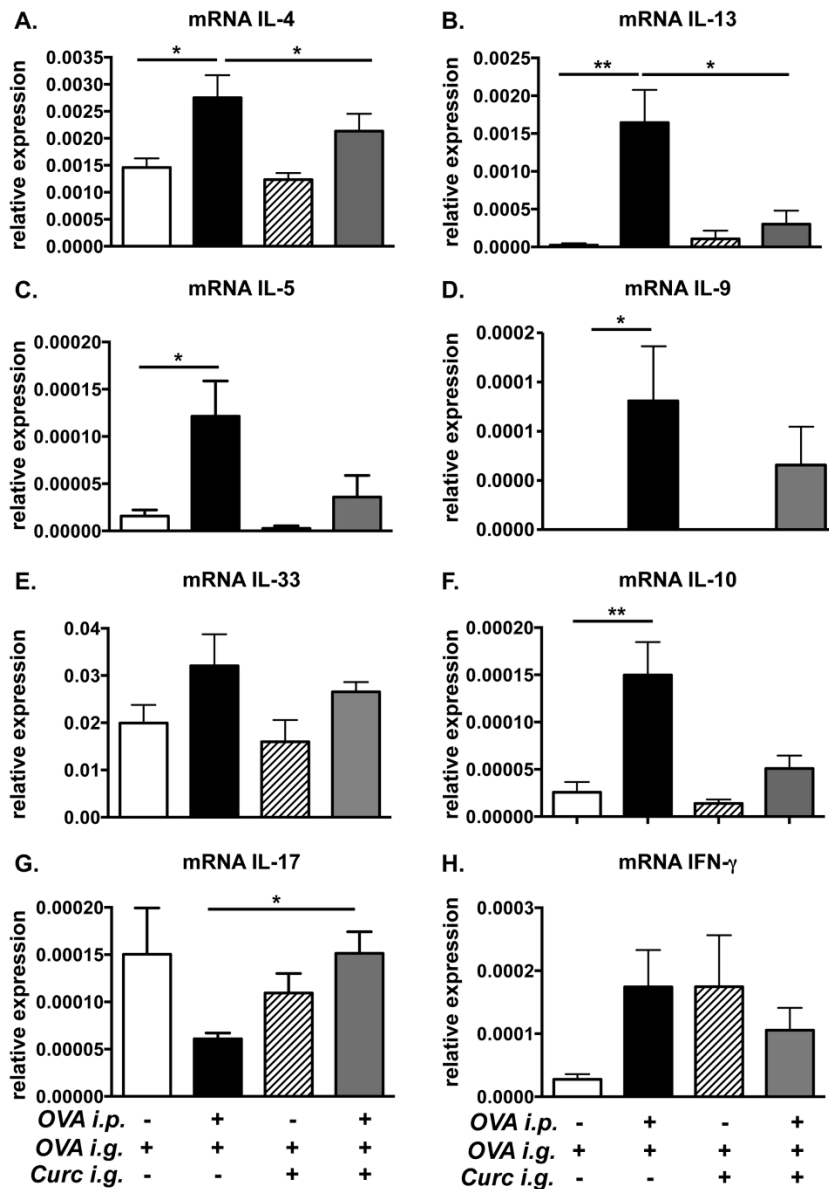


Figura 33. “(A-H) Expression of jejunal mRNA for various cytokines is shown.” ⁽³⁴⁾

Dando una considerazione finale a questo articolo si può confermare che: in modello animale allergico, curcumina abbia la capacità di ridurre il livello di IgE, il sintomo di diarrea e infine sopprimere le risposte T_H2 e la produzione di mastociti. ⁽³⁴⁾

Sempre nel 2015 un altro gruppo di ricercatori, Shin HS, *et al.* ⁽³⁵⁾, ha sperimentato la curcumina in topi con allergia indotta da OVA. In questo caso sono stati formati cinque gruppi: il primo (naive), il secondo (sham), ovvero topi sensibilizzati a OVA e i rimanenti tre gruppi comprendono modelli allergici ai quali viene somministrata curcumina rispettivamente ai dosaggi di 100 mg/kg di peso corporeo (gruppo definito “estratto di curcumina” o in inglese “turmeric extract”), 3 mg/kg (curcumina L) e infine 30 mg/kg (curcumina H). Per quanto riguarda i risultati ottenuti, gli autori esprimono che il gruppo sham sia caratterizzato da temperatura rettale elevata, alti livelli di IgE specifiche per OVA e citochine associate alla risposta T_H2 , inoltre anche la percentuale di risposta anafilattica e il sintomo diarroico si presentano ingenti. Dall’altro lato il trattamento con curcumina ha alleviato e migliorato quasi

tutti gli aspetti negativi verificati nel gruppo sham. Più precisamente i gruppi turmeric, curcumina L e H hanno mostrato una riduzione considerevole della temperatura rettale e dell'anafilassi, mentre per quanto riguarda la frequenza di diarrea è rimasta invariata rispetto al gruppo non trattato. (Figura 34)

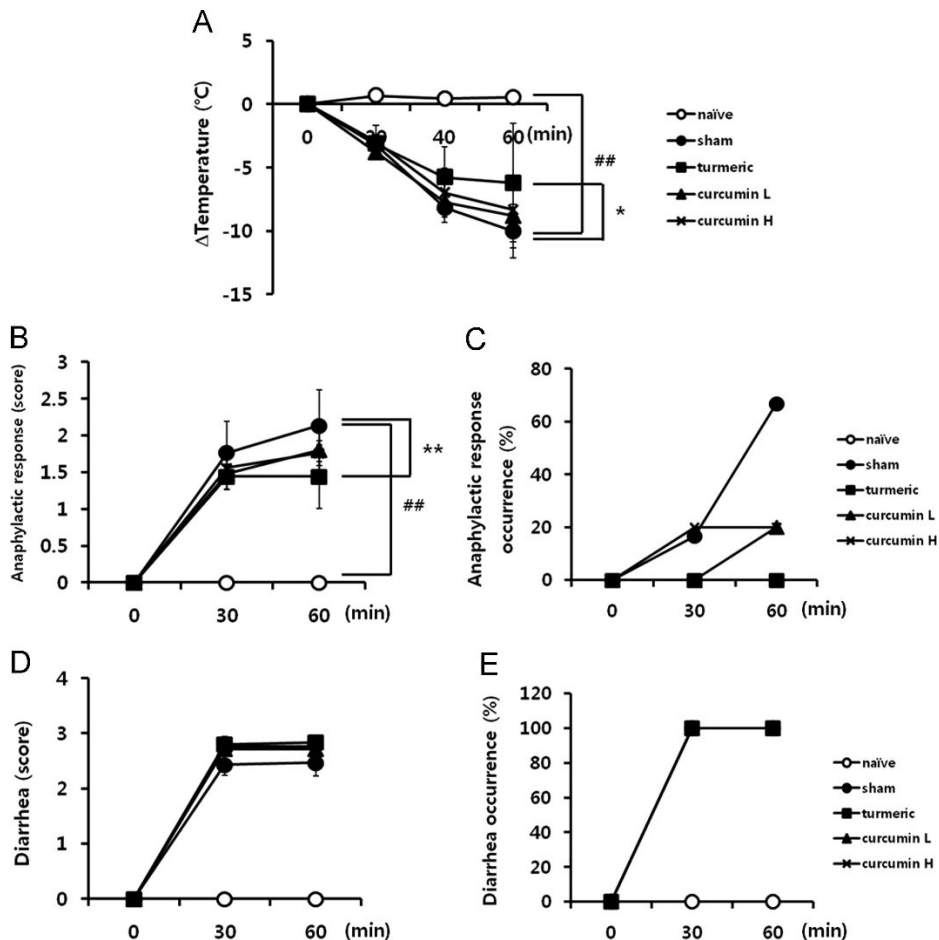


Figura 34. “Effects of turmeric extracts and curcumin on OVA-induced food allergy symptoms. Food allergy symptoms induced by OVA were evaluated (decreased rectal temperature, anaphylactic response, and diarrhea) for 1 h after challenge with OVA. (A) Rectal temperature was measured every 20 min for 1 h after the sixth challenge with OVA. (B) Anaphylactic response score and anaphylactic response occurrence (C) were also evaluated every 30 min for 1 h after the sixth challenge of OVA. (D) Diarrhea score and diarrhea occurrence (E) were evaluated every 30 min for 1 h after the sixth challenge with OVA. ⁽³⁵⁾

Dalle successive analisi delle citochine prodotte, si consegue che tutti i tre estratti di curcuma abbiano ripristinato il rapporto T_H1/T_H2 , promuovendo infatti il tipo 1, piuttosto che il tipo 2 correlato alle reazioni allergiche. Più precisamente IL-4, IL-5 e IL-13 (associate a T_H2) sono state diminuite nei tre gruppi trattati, in particolare un risultato notevole lo ha dato la curcumina ad alto dosaggio (H). IFN- γ , correlato a T_H1 , che ovviamente si presentava a livelli bassi nel gruppo sham, ha visto un aumento grazie all’estratto di curcuma, ma non da curcumina L ed H. Anche IL-17 cala all’aumentare della dose di curcumina rispetto al gruppo allergico sham; mentre l’ultimo parametro valutato legato alle cellule Treg, TGF- β 1, è stato aumentato da curcumina. ⁽³⁵⁾ (Figura 35)

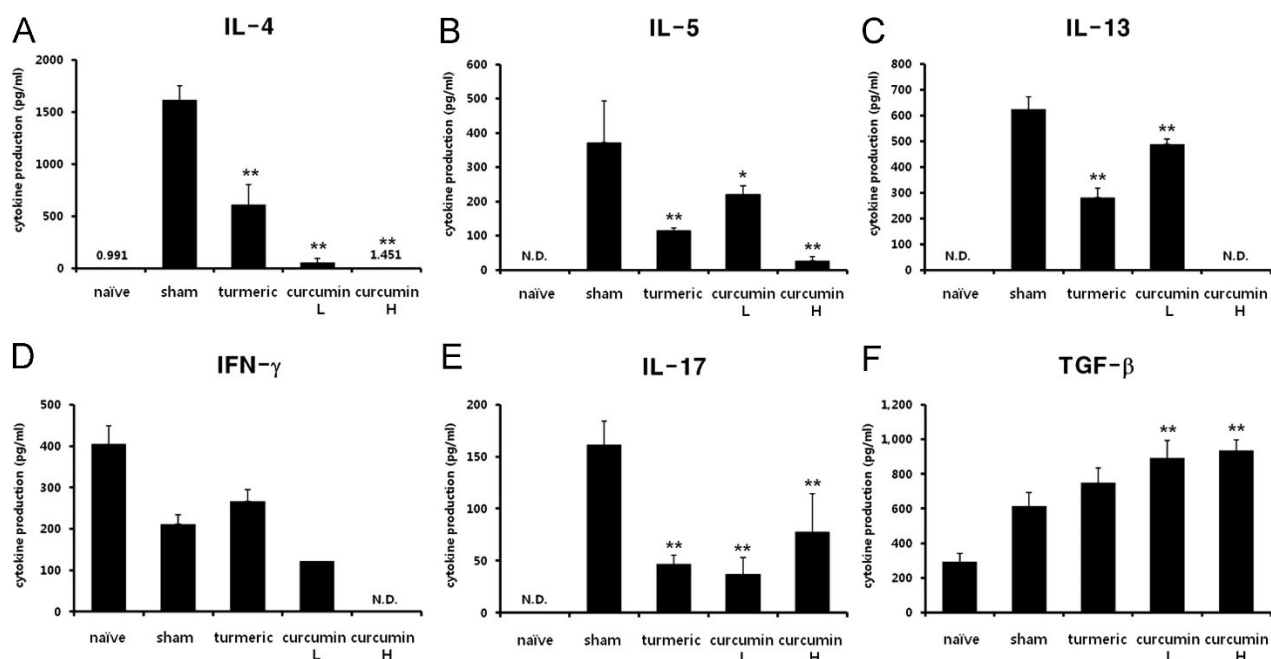


Figura 35. “Immunomodulatory effects of turmeric extracts and curcumin on cytokine patterns in splenocytes. Mice were sacrificed by cervical dislocation on day 43, and spleens were removed. Splenocytes were isolated from the spleen and cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 72 h in the presence of OVA. Cytokines produced from splenocytes were detected by ELISA. IL-4 (A), IL-5 (B), and IL-13 (C) were measured as Th2 cytokines. IFN- γ (D), IL-17 (E), and TGF- β (F) were measured as Th1, Th17, and Treg cytokine, respectively. ⁽³⁵⁾

3.5 Il licopene nell’allergia alle uova

Il licopene, una nota sostanza vegetale facente parte del gruppo dei carotenoidi, è considerato un ottimo antiossidante contro i radicali liberi; per questo viene ad essere utilizzato come principio attivo contro l’invecchiamento, le malattie degenerative e persino contro alcune forme di cancro. Un altro aspetto positivo che si riconosce a questa molecola è che sia disponibile in moltissime fonti alimentari di utilizzo comune (soprattutto pomodoro e suoi derivati, ma anche anguria, pompelmo e molti altri), quindi accessibile a chiunque in quantità ragionate.

Negli ultimi anni, più precisamente nel 2022, un gruppo di ricercatori si è concentrato sull’identificare una possibile attività antiallergica da parte del licopene, raggiungendo anche risultati incoraggianti.

Ushiroda C, *et al.*, (2022) ⁽³⁶⁾, come già anticipato, hanno dimostrato le potenzialità del licopene in un modello di allergia alimentare a OVA. Oltre al licopene, la sostanza messa in primo piano dallo studio, sono stati valutati contemporaneamente anche altri tre carotenoidi importanti dal punto di vista nutrizionale, ovvero β -carotene, astaxantina e luteina, che si vedranno successivamente non avere alcun effetto antiallergico. Inizialmente sono stati costituiti i seguenti gruppi: control (veicolo), licopene (allergia + dieta allo 0.01% licopene), astaxanthin (allergia + dieta allo 0.01% astaxantina), β -carotene (allergia + dieta allo 0.01% β -carotene) e infine lutein (allergia + dieta allo 0.01% luteina). Dalle prime analisi si evidenzia che solamente il gruppo licopene abbia incrementato in modo considerevole il livello di cellule T regolatorie, questo lo si nota dai grafici della figura 36 che indicano i livelli di FOXP3⁺, principale fattore di espressione delle Treg, esaminati nella lamina propria dell’intestino dei topi dopo aver somministrato una concentrazione della sostanza attiva pari a 1 e 10 nM.

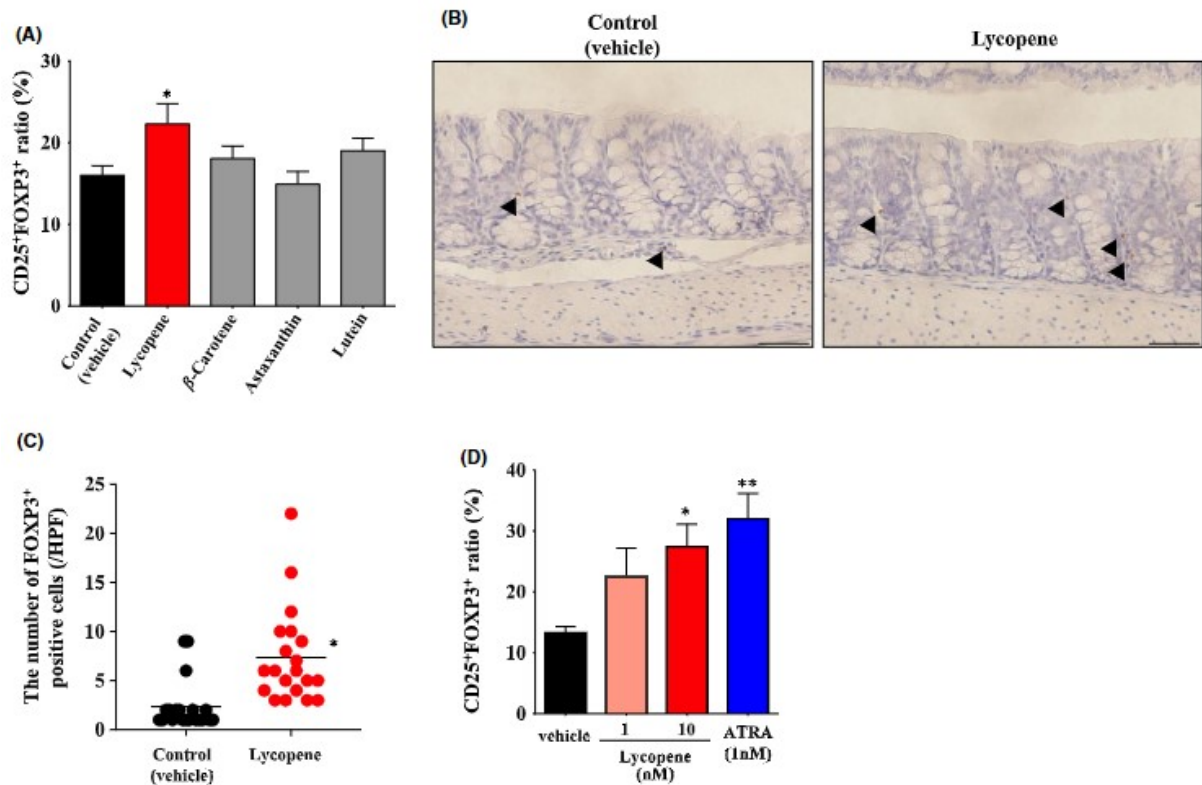


Figura 36. “Lycopene increases colonic Treg in mice. (A) Colonic lamina propria cells were collected and stained with anti-CD4 antibody, anti-FOXP3 antibody and anti-CD25 antibody. The cells were analysed by flow cytometry, and the ratio of FOXP3⁺CD25⁺ cells (Treg) to CD4⁺ cells was calculated. (B, C) After sacrifice, colon tissue was immunohistochemically stained with anti-FOXP3 antibody, and the number of FOXP3⁺ cells was counted. (B) Representative histology of colon samples. Arrowheads indicate FOXP3⁺ cells. (C) The data of (B) are summarized. Each symbol indicates an individual value. The horizontal bar indicates the mean. (D) Spleens were collected from BALB/c mice and homogenized to obtain splenocytes. Then, naive CD4⁺ T cells were isolated and cultured in the presence of anti-CD3/CD28 antibody and TGF- β for 96 h.”⁽³⁶⁾

Dato che solamente il licopene, tra tutti i carotenoidi provati, ha dato buoni risultati, nel susseguirsi della sperimentazione vengono tralasciati i gruppi astaxanthin, β -carotene e lutein e presi in considerazione invece, sham (controllo non allergico), allergy control (controllo allergico) e infine lycopene (allergia + licopene). Oltre a stimolare le cellule Treg, il licopene ha diminuito, rispetto ai topi non trattati, l’insorgenza di diarrea e la temperatura rettale, anche se quest’ultima non in modo significativo. (Figura 37)

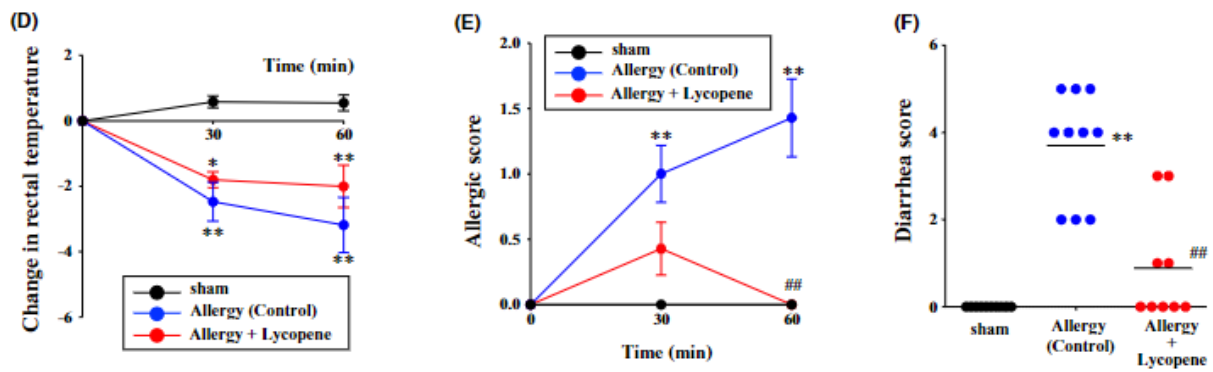


Figura 37. “The graph shows the mean of each group. (D-F) At the end of the study, mice were orally administered OVA to evaluate rectal temperature (D), allergic score (E) and diarrhoea score (F). (F) Each symbol indicates an individual value, and the horizontal bar indicates means.”⁽³⁶⁾

Come ultima analisi si dimostra che il licopene favorisca la riduzione delle citochine legate alle cellule T_H2 e medi una maggiore produzione di T_H1 . Per fare questo si è misurata la concentrazione di IL-4, IL-5 e IL-13 per il sottotipo T_H2 e IFN- γ per T_H1 , che, rispettivamente, le prime si presentavano ridotte, mentre l’ultimo fattore aumentato rispetto al gruppo allergy control. Inoltre l’assunzione di licopene ha vantato anche di una soppressione dei mastociti e loro degranulazione rilevante.⁽³⁶⁾ (Figura 38)

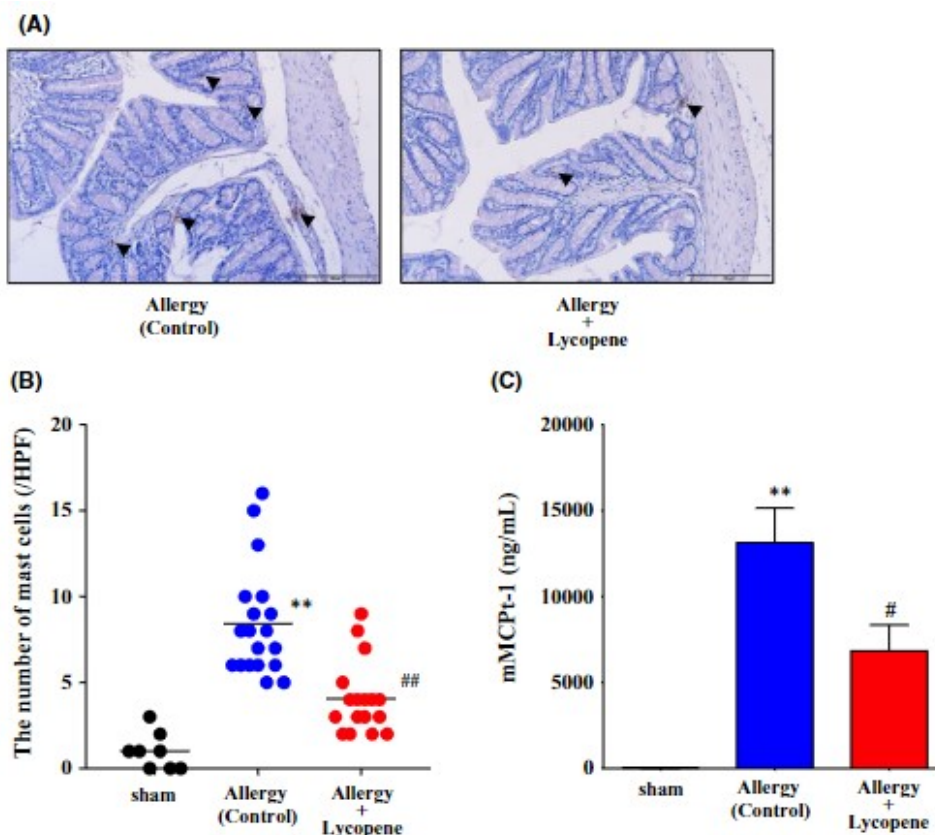


Figura 38. “The number of mast cell tryptase+ cells in colon tissue (A, B) and plasma mast cell protease-1 (mMCPT-1) concentration (C). (A) Representative histology of colon samples. Arrowheads indicate mast cell tryptase+ cells. (B) The results of (A) are summarized. Each symbol shows an individual value, and a horizontal line shows mean.”⁽³⁶⁾

3.6 La quercetina nell'allergia all'uovo

La quercetina è un flavonoide presente abbondantemente nel regno vegetale, questo polifenolo viene estratto soprattutto da piante quali l'ippocastano (*Aesculus hippocastanum L.*), il ginkgo (*Ginkgo biloba L.*), il biancospino (*Crataegus monogyna J.*) e l'iperico (*Hypericum perforatum L.*). Integratori alimentari a base di quercetina sono noti per attività antiossidanti e antinfiammatorie, perché in grado di contrastare i radicali liberi ed inibire la produzione di molecole pro-infiammatorie.

Un recente articolo del 2020, dà delle prove soddisfacenti, anche se in vitro e su modello animale, che la quercetina possa assumere un ruolo protettivo nelle allergie alimentari.

Si tratta dello studio di Zhang T, *et al.* ⁽³⁷⁾, nel quale inizialmente viene eseguita una sperimentazione in vitro susseguita successivamente, per i buoni risultati ottenuti, su modello murino. Nella prima fase si conferma che la quercetina sia in grado di coniugarsi con ovalbumina sviando in questo modo il riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'allergene. La prima sperimentazione è stata effettuata su 12 campioni sierici di bambini allergici alle uova donati dall'ospedale pediatrico di Shenzhen (Cina). In dettaglio sono stati costituiti campioni con solo OVA, e altri due rispettivamente con OVA coniugata con quercetina per metodo alcalino (OVA-QUE alcalina) e per metodo dei radicali liberi (OVA-QUE radicalica). Dalle analisi delle IgE specifiche per OVA, si evince che i campioni sierici in presenza dell'allergene coniugato (sia alcalino che radicalico) presentino un valore minore delle immunoglobuline rispetto al controllo OVA e anche livelli più bassi di istamina e IL-6. (Figura 39)

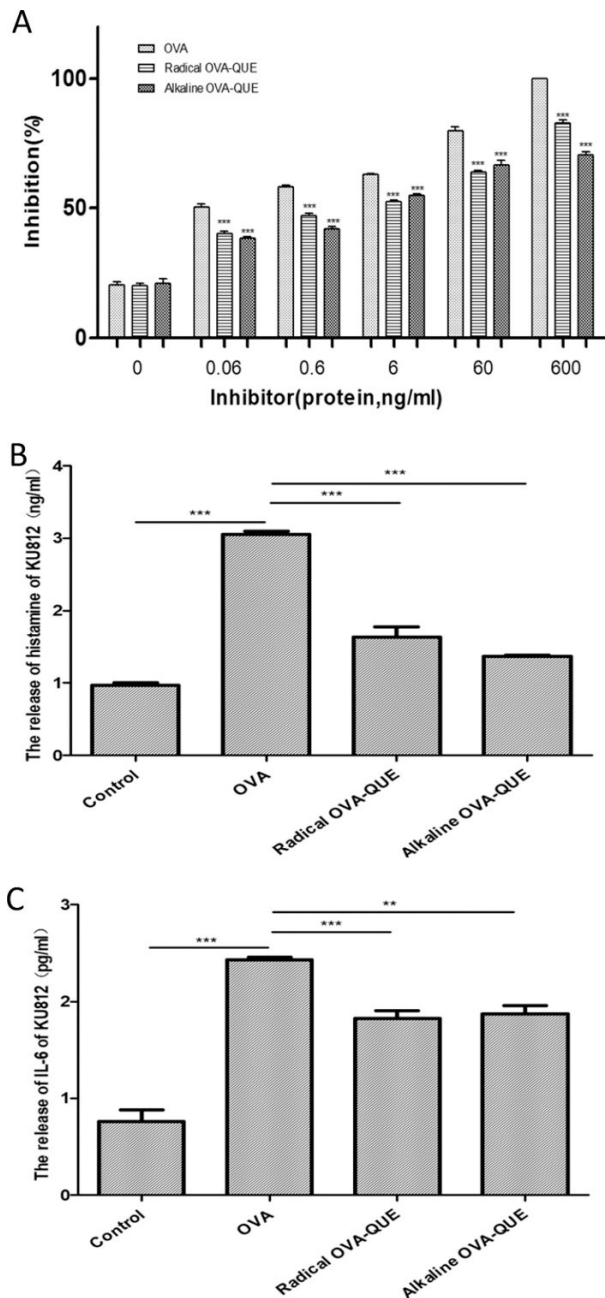
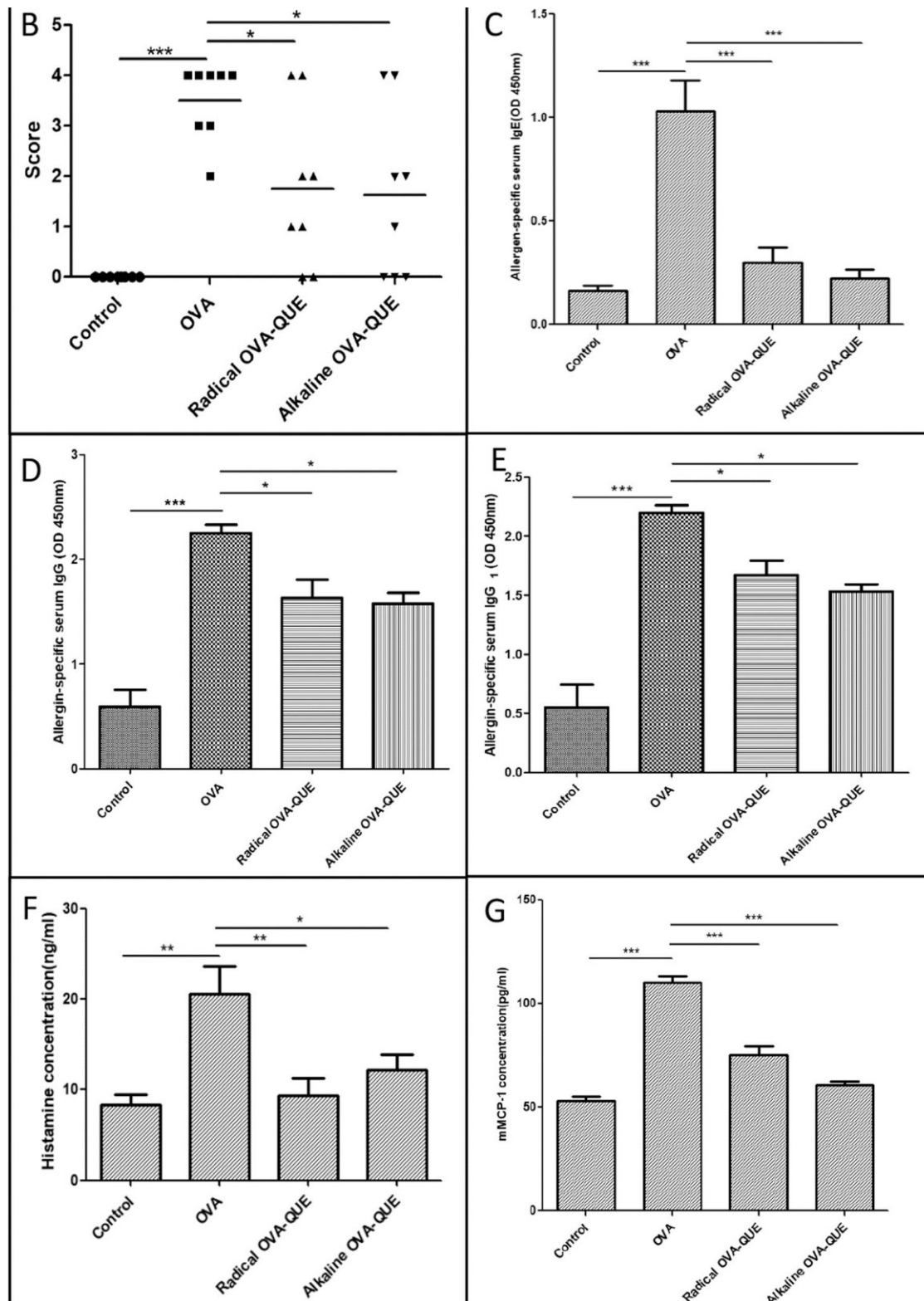


Figura 39. “Capacità di legame delle IgE rilevata mediante ELISA (A), rilascio di istamina basofila con degranolazione delle cellule KU812 (B) e rilascio di IL-6 con degranolazione delle cellule KU812 (C) con coniugati OVA o radicali o alcalini OVA-QUE.” ⁽³⁷⁾

Per quanto riguarda la seconda parte dello studio sperimentale in vivo su topo, si evince che i modelli trattati con quercetina abbiano avuto una risoluzione della gravità dei sintomi allergici, mentre i risultati delle altre analisi effettuate sono dimostrati graficamente nella figura 40 ed illustrati dagli autori nel seguente ordine:

“Abbiamo rilevato IgE siero-specifiche, IgG, IgG1, istamina e mMCP-1 nel siero di topo per valutare il potenziale allergenico dell'OVA dopo la coniugazione con QUE. Rispetto al solo OVA, i gruppi coniugati OVA-QUE radicali e alcalini hanno mostrato livelli sierici ridotti di IgE, IgG, IgG1, istamina e mMCP-1. I livelli di citochine correlate a Th2 (IL-13, IL-4 e IL-5)

e una citochina correlata a Th1 ($IFN-\gamma$) sono stati rilevati nella milza di topo per determinare ulteriormente se la coniugazione di OVA con QUE potesse influenzare la produzione di citochine nella risposta immunitaria. Rispetto al solo OVA, i gruppi coniugati OVA-QUE radicali e alcalini hanno mostrato una marcata riduzione della produzione di citochine IL-13, IL-4 e IL-5 nelle cellule spleniche, con un leggero aumento del livello di $IFN-\gamma$.” (38)



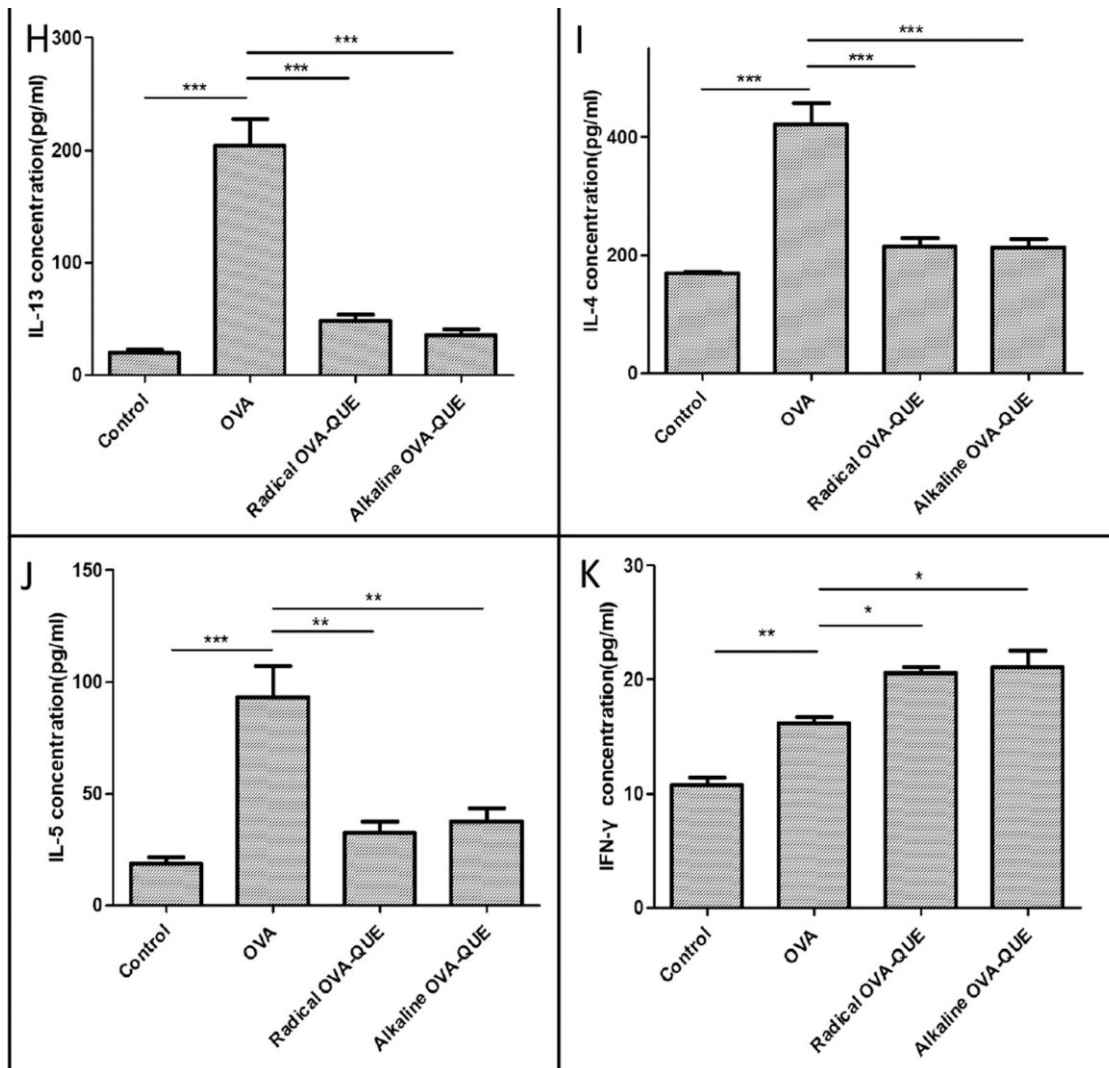


Figura 40. “(B) valutati i sintomi su una scala da 0 (nessun sintomo) a 5 (morte). Livelli di IgG (C), IgG1 (D), IgE (E), istamina plasmatica (F) e mMCP-1 (G) nel siero di topi. Livelli di citochine IL-13 (H), IL-4 (I), IL-5 (J) e γ -IFN (K) nella milza di topo. ⁽³⁸⁾

3.7 L-teanina ed epigallocatechina gallato nell’allergia alle uova

La L-teanina (LTA) è un aminoacido di origine vegetale strutturalmente simile alla glutammina, macromolecola essenziale nel metabolismo umano. Ad essa vengono riconosciute proprietà sedative e rilassanti, questo perché agisce in modo indiretto nella sintesi dell’acido gamma-amminobutirrico (GABA) che media un’azione inibitoria nel sistema nervoso centrale. L’epigallocatechina gallato (EGCG), invece, è un importante flavonoide con attività antiossidante nota, capace quindi di contrastare i radicali liberi e diverse forme tumorali, inoltre ha un’azione benefica nell’ambito delle malattie cardiovascolari.

Entrambe i composti sono contenuti principalmente nel tè verde, ottenuto dalle foglie di *Camelia sinensis L.*

Di seguito si analizza uno studio sull’utilizzo di queste due sostanze, sia singolarmente che in combinazione, nel ripristino dell’allergia alimentare a OVA in modelli murini.

Xu W, *et al.*, (2023) ⁽³⁸⁾ hanno composto 7 gruppi totali di 10 topi ognuno, evidenziando poi la gravità delle reazioni allergiche, i livelli di immunoglobuline legate a OVA e molti altri fattori collegati all'ipersensibilità che caratterizzano le differenti classificazioni riportate in tabella 3, suddivise in base al tipo e quantità di sostanze somministrate agli animali oggetto dello studio.

Tabella 3. "suddivisione dei gruppi dello studio 38."

Nome gruppo	Somministrazione di:
CK (gruppo normale)	veicolo
OVA	OVA
LO	OVA + 100 mg/kg LTA
EO	OVA + 100 mg/kg EGCG
LLEO	OVA + 50 mg/kg LTA+EGCG
MLEO	OVA + 100 mg/kg LTA+EGCG
HLEO	OVA + 150 mg/kg LTA+EGCG

Inizialmente si evince che il gruppo OVA presenti sintomi allergici significativamente elevati, al contrario la combinazione di LTA ed EGCG è riuscita ad alleviarli in modo considerevole. Infatti, come riportato nella figura 42, i gruppi MLEO e HLEO hanno visto in principio un aumento del peso corporeo dei topi, i punteggi riferiti alla milza e al timo diminuiti (riassunti in figura 41) e una gravità dell'allergia minore rispetto alla situazione presentata nei topi OVA. Successivamente è stata compiuta anche un'analisi della sezione intestinale, dove si è andati a caratterizzare la struttura del digiuno e l'eventuale degranolazione dei mastociti. Ovviamente il gruppo OVA mostra un intestino poco integro nella sua fisiologia rispetto ai gruppi trattati con gli estratti vegetali e per quanto concerne il numero identificato di mastociti, indicati con una freccia sempre nella figura 42, cala sempre di più all'aumentare della quantità della combinazione di LTA e EGCG, ovvero nei gruppi MLEO e HLEO.

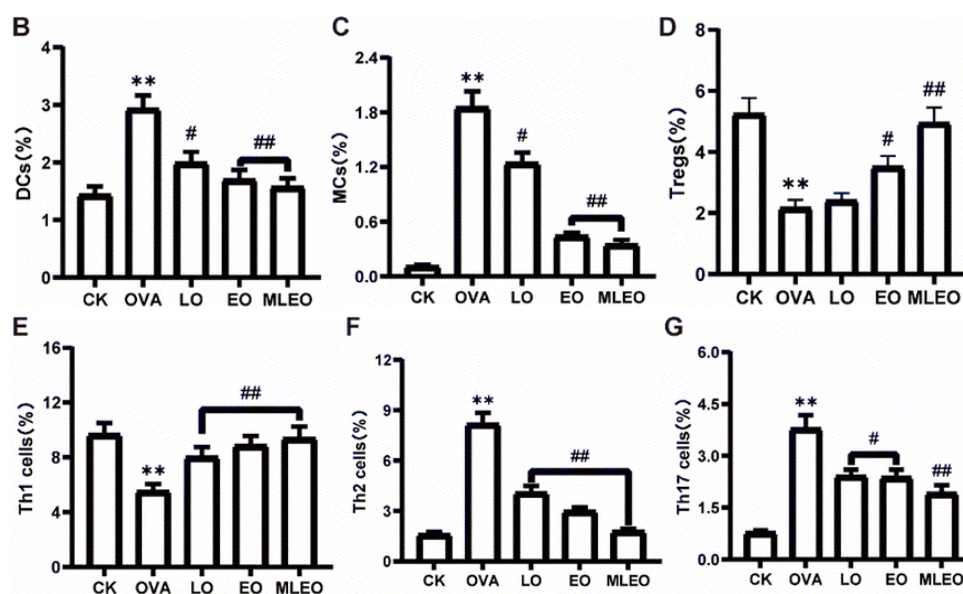


Figura 41. "(B) Effetto di LO, EO e MLEO sulla frequenza delle DC. (C) Effetto di LO, EO e MLEO sulla frequenza degli MC. (D) Effetto di LO, EO e MLEO sulla frequenza delle Treg. (E) Effetto di LO, EO e MLEO sulla frequenza delle cellule Th1. (F) Effetto di LO, EO e MLEO sulla frequenza delle cellule Th2. (G) Effetto di LO, EO e MLEO sulla frequenza delle cellule Th17." ⁽³⁸⁾

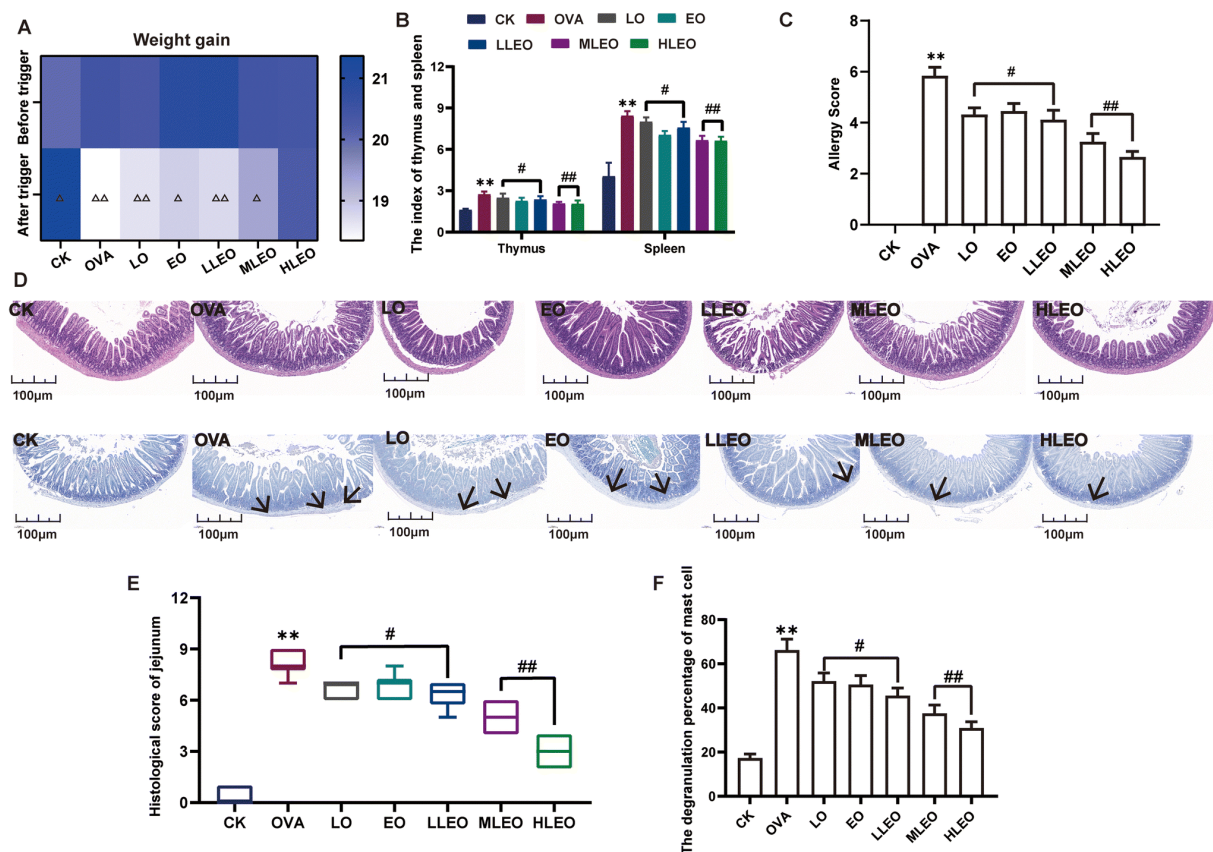


Figura 41. “L'intervento combinato di LTA ed EGCG ha alleviato meglio l'allergia agli ovuli. (A) Effetto di LTA o EGCG da solo e intervento di LTA + EGCG sull'aumento di peso dei topi durante l'esperimento (n = 10). Rispetto a prima del trigger, (B) Effetto del solo intervento di LTA o EGCG e LTA + EGCG sugli indici di milza e timo (n = 10). (C) Effetto del solo intervento di LTA o EGCG e LTA + EGCG sul punteggio di allergia nei topi sensibili agli OVA (n = 10). (D) Effetto del solo intervento di LTA o EGCG e LTA + EGCG sulla struttura e sulla degranulazione del digiuno. (E) Punteggio istologico del digiuno (n = 3). (F) La percentuale di degranulazione dei mastociti del digiuno (n = 3).”⁽³⁸⁾

Nella stessa sperimentazione gli autori hanno eseguito anche una caratterizzazione del microbiota intestinale dei diversi gruppi, essendo consapevoli che la comunità batterica, fondamentale nel corso delle allergie alimentari, potesse essere influenzata positivamente da LTA ed EGCG. Infatti, dal sequenziamento del 16S rRNA batterico nelle feci dei topi, si dimostra che in tutti i gruppi con somministrazione degli estratti del tè verde, in particolare quelli in combinazione, ci sia una maggiore diversità e abbondanza di specie microbiche a confronto del gruppo OVA. Più precisamente Xu W. e i suoi colleghi riferiscono che:

“Il microbiota intestinale dei topi EO e MLEO aveva comunità tassonomiche simili e un'abbondanza relativamente elevata di *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Helicobacteraceae*. A livello familiare, i livelli di abbondanza di *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* o *Enterobacteriaceae* nei topi LO non erano significativamente differenti. Nei topi EO, l'abbondanza di *Lactobacillaceae* e *Ruminococcaceae* era maggiore e quella di *Enterobacteriaceae* era inferiore. Inoltre, nello stesso gruppo, l'abbondanza di *Lachnospiraceae* era significativamente aumentata e quella di *Helicobacteraceae* erano significativamente diminuite. Nei topi MLEO, l'abbondanza di *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* era significativamente aumentata e quella di *Helicobacteraceae* era significativamente ridotta.”⁽³⁸⁾ (Figura 42)

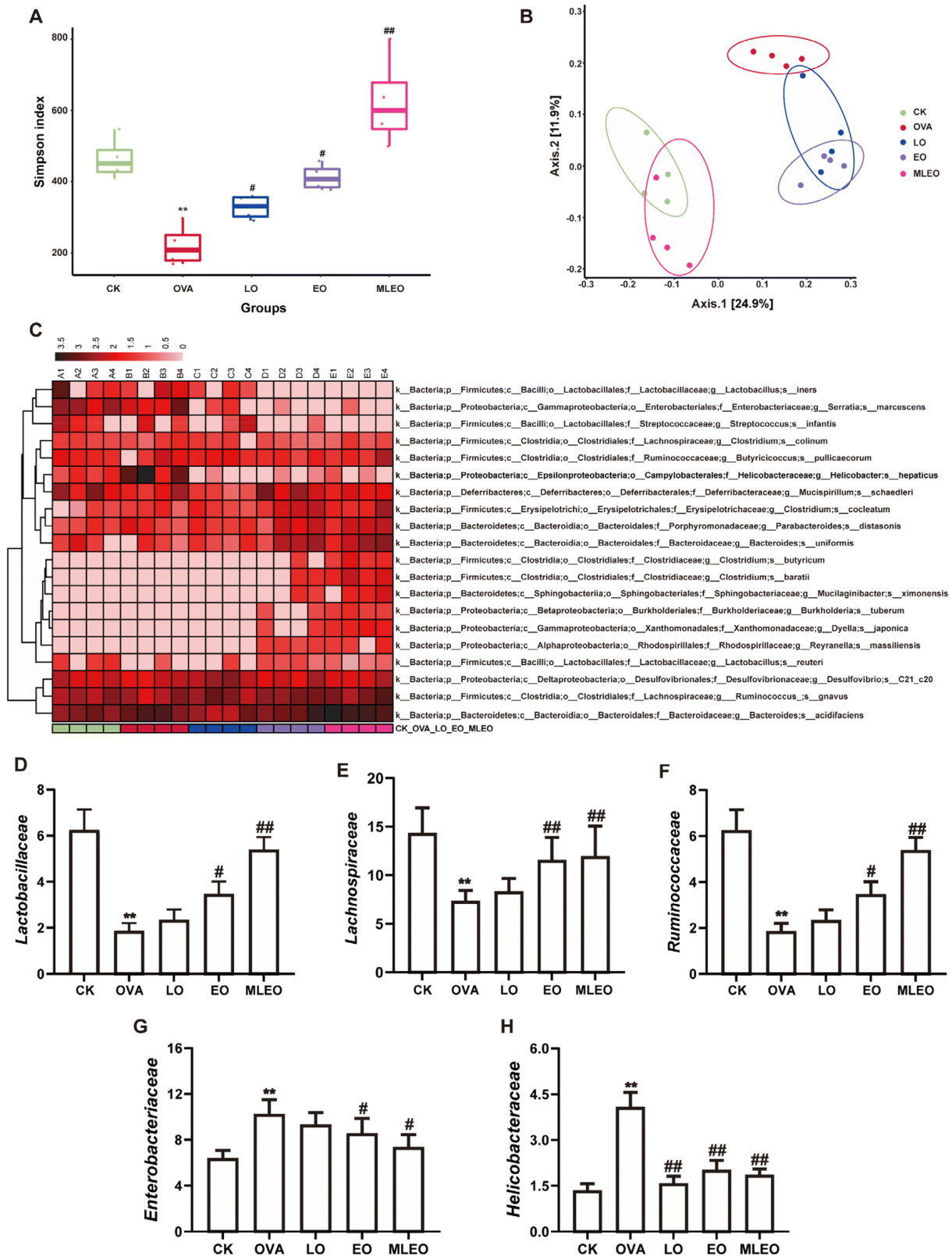


Figura 42. “(A) Diversità alfa (indice Simpson). (B) Diversità beta (analisi dei componenti principali, PCoA). (C) Riepilogo della mappa termica del microbiota intestinale differenziale. (D) Effetto di LO, EO e MLEO sull’abbondanza di Lactobacillaceae. (E) Effetto di LO, EO e MLEO sull’abbondanza di Lachnospiraceae. (F) Effetto di LO, EO e MLEO sull’abbondanza di Ruminococcaceae. (G) Effetto di LO, EO e MLEO sull’abbondanza di Enterobacteriaceae. (H) Effetto di LO, EO e MLEO sull’abbondanza di Helicobacteraceae.” (38)

3.8 Epigallocatechina gallato e acido clorogenico nell'allergia a tropomiosina

L'epigallocatechina gallato (EGCG), come è già stato descritto nel capitolo precedente, è un flavonoide antiossidante di grande interesse, presente soprattutto nell'estratto di tè verde di *Camelia sinensis*.

La seguente nuova sostanza, che prende importanza già nel titolo di questo sottocapitolo, è l'acido clorogenico (CA). Fa parte anch'esso dei composti fenolici e si trova abbondantemente nel caffè verde (la sua concentrazione diminuisce con il processo di torrefazione). Le sono attribuite diverse attività, quali quella antiossidante e ipoglicemizzante (riduce la glicemia post-prandiale).

Queste due molecole vengono prese in considerazione nell'unico studio trovato in letteratura riguardo l'allergia alimentare a tropomiosina (TM) di gamberetti completato su modello animale.

Si tratta dell'articolo di Lv L, *et al.*, (2021) ⁽³⁹⁾, nel quale si espone la capacità dell'acido clorogenico e di EGCG nel formare complessi con tropomiosina, modificandone così la struttura conseguentemente non più identificabile dalle immunoglobuline specifiche per l'allergene. La tropomiosina di gamberetti ha un peso molecolare di 36 kDa, all'aggiunta di CA ed EGCG si è visto aumentare rispettivamente di +32 kDa circa e +25 kDa circa, suggerendo che i due estratti siano in grado di formare complessi con la proteina. Successivamente si è esaminato il legame con IgE e IgG specifiche per TM, risultando che le conformazioni di EGCG-TM e CA-TM diminuiscano la percentuale di capacità di entrambe le tipologie di immunoglobuline di riconoscere l'allergene. Di conseguenza questo ha portato anche a un minore rilascio di istamina e citochine pro-infiammatorie, come IL-4 e IL-13 rispetto al campione privo dei derivati vegetali. Per quanto riguarda la seconda parte dello studio effettuata su modello animale, sono stati creati quattro gruppi di topi BALB/c: PBS (controllo non allergico), TM (sensibilizzato con 200 µg di TM), EGCG-TM (sensibilizzato con 200 µg di TM + EGCG) e infine CA-TM (sensibilizzato con 200 µg di TM + CA), ognuno composto da 10 modelli murini. Come nella sperimentazione in vitro, la somministrazione intraperitoneale dei due complessi ha determinato un calo (3 volte maggiore) dei livelli di IgE e IgG1 specifici per TM, come anche il rilascio di istamina, IL-4 e IL-13 è diminuito in modo considerevole. ⁽³⁹⁾

Conclusioni

La percentuale delle allergie alimentari nel mondo occidentale è in costante aumento, e non esiste ancora una cura definitiva per questa condizione, se non l'evitare qualsiasi alimento che possa contenere l'allergene. Questo può portare a un disagio sia fisico che psicologico del paziente, oltre all'insorgenza di carenze nutrizionali e possibili patologie correlate. Inoltre, si devono sostenere ingenti spese sanitarie per trattamenti che puntano ad alleviare semplicemente i sintomi allergici gravi, ma non a risolvere la vera causa scatenante l'ipersensibilità.

Negli ultimi anni, la consapevolezza che il microbiota intestinale giochi un grosso ruolo nel decorso delle allergie alimentari, ha portato molti studiosi a sperimentare l'utilizzo di determinati ceppi batterici nel ripristino delle disbiosi associate alla problematica. Seppur meno documentato rispetto ai probiotici, anche il mondo vegetale offre una serie di molecole rivelatesi utili nei casi di ipersensibilità agli alimenti.

Gli studi presenti in letteratura si concentrano principalmente sulle allergie alle uova, al latte e alla tropomiosina di gamberetti e per la maggior parte sono stati condotti su modelli murini. La ricerca a riguardo, incoraggiata da risultati promettenti, è in costante crescita e molto probabilmente potrà vantare in futuro una sua applicazione.

Nel corso della preparazione di questa tesi, non sono stati trovati articoli che prendano in esame l'uso combinato di probiotici e botanicals nei casi di ipersensibilità agli alimenti, infatti nel corso della tesi vengono presi in considerazione separatamente (probiotici nel capitolo 2 ed estratti vegetali nel capitolo 3). Tuttavia, è possibile che questi due approcci possano agire sinergicamente tra loro rivelandosi di conseguenza ancor più efficaci nel trattamento delle allergie alimentari. In altre patologie, diverse da quelle allergiche, è ormai risaputo che la combinazione tra il mondo vegetale e quello dei probiotici porti a risultati straordinari; in supporto a ciò, si fa riferimento allo studio di Panoraia B., *et al.* ⁽⁴⁰⁾ che tratta di disordini gastrointestinali, come la sindrome dell'intestino irritabile, dispepsia e altre disfunzioni del tratto digestivo. La sperimentazione ha ottenuto un grande successo grazie all'accostamento di determinati probiotici e fitoestratti in grado di promuovere sinergicamente un microbiota intestinale funzionale a un miglior stato di salute. ⁽⁴⁰⁾

Per quanto riguarda i probiotici, è emerso che nell'allergia al latte, l'unica sperimentata su uomo, abbiano influito positivamente le specie *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e *Bifidobacterium bifidum* TMC3115. Nel primo caso il probiotico ha favorito l'arricchimento della classe *Clostridia*, in particolare *Roseburia*, *Coprococcus* e *Blautia* e viceversa una riduzione dei *Bacteroides*. Questo cambiamento ha comportato ulteriormente un aumento dei livelli di butirrato, un noto metabolita batterico riconosciuto come stimolatore delle cellule Treg e della barriera epiteliale del colon, nei campioni fecali dei bambini. ^{(20), (21)}. Il secondo probiotico testato per la medesima allergia, *Bifidobacterium bifidum* TMC3115, ha dimostrato di ridurre in modo significativo i casi allergici. Anch'esso ha contribuito al ripristino della disbiosi associata all'ipersensibilità, riducendo i livelli totali di IgE e aumentando contemporaneamente le citochine anti-infiammatorie come IL-10, mentre si osserva una diminuzione delle citochine pro-infiammatorie come il TNF α .

Per le altre due allergie approfondite nella tesi, come precedentemente descritto, gli studi sono riferiti su modelli animali.

Per l'allergia alle uova (OVA), sono stati identificati i seguenti ceppi batterici utili: *Bifidobacterium breve* M-16V, *Lactobacillus plantarum* JC7, *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1189, *Lactobacillus reuteri* CCFM1190 e *Bifidobacterium*

longum CCFM1029. Le ultime tre specie sono state esaminate nello stesso studio, mentre i primi due in ricerche diverse. In ogni caso, tutti i probiotici hanno dimostrato di arricchire il microbiota intestinale dei soggetti allergici rispetto a quelli non trattati. Ulteriormente il miglioramento delle condizioni allergiche è correlato agli effetti di tali specie batteriche, che favoriscono le cellule T_{H1} rispetto ai linfociti T_{H2} (T_{H2} aumentano il rilascio delle IgE), inducono una maggiore tolleranza, riducono le IgE specifiche per OVA e provocano un minor rilascio delle citochine IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 (attività pro-infiammatoria), aumentando invece la produzione di IL-10 (attività immunosoppressiva).^{(23), (24), (25)}

Per quanto riguarda l'allergia alla tropomiosina di gamberetti, si evidenziano due studi. Uno di essi ha testato l'efficacia di *Bifidobacterium infantis* (Binf), nel mediare l'aumento di *Dorea*, che a sua volta promuove le cellule Treg, e una diminuzione di *Ralstonia* (promuove T_{H2}) che rispettivamente nei soggetti allergici si dimostravano ridotti nel primo caso e abbondanti nell'altro. Mentre, l'altro articolo ha studiato due probiotici potenzialmente presenti nello yogurt (alimento disponibile a chiunque): *Bifidobacterium longum* (Bi) e *Bacillus coagulans* (Bc). L'integrazione di entrambi i ceppi ha modulato positivamente il microbiota intestinale, aumentando *Bacteroides* e *Lachnospiraceae*, correlata quest'ultima a una maggiore produzione di butirrato, e diminuendo i *Firmicutes*. L'eubiosi ottenuta dalla loro supplementazione ha promosso specie batteriche stimolanti maggiormente cellule Treg, piuttosto che le T_{H2}.^{(27), (28)}

Gli studi sugli estratti vegetali sono basati su modelli murini con allergia indotta da OVA, con un solo studio che si concentra sulla tropomiosina di gamberetti. Purtroppo per l'allergia al latte non è stato riscontrato alcun articolo. La maggior parte dei botanicals trattati, rientra nella classe dei polifenoli, come i flavonoidi di *Scutellaria baicalensis*, resveratrolo, curcumina, quercetina ed epigallocatechina gallato, oltre ad altri composti come il licopene (carotenoide) e la L-teanina (amminoacido). Tutte queste molecole si sono dimostrate efficaci nella risoluzione dei sintomi allergici rispetto ai gruppi non riceventi alcun fitoestratto, con evidenze significative nella riduzione dei livelli di IgE specifiche per l'allergene e delle citochine correlate ai linfociti T_{H2} e nell'induzione di una maggiore tolleranza.⁽³⁰⁻³⁹⁾ Una citazione importante va fatta allo studio (38), il quale, dopo aver verificato la proprietà antiallergica di L-teanina ed EGCG, ha approfondito l'eventuale modulazione compositiva del microbiota intestinale dei soggetti, risultando che, dopo la somministrazione delle due sostanze, la comunità batterica si sia arricchita con un'abbondanza relativa di *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*.⁽³⁸⁾

In conclusione determinati probiotici e fitoestratti mostrano potenziale utilità nel trattamento delle allergie alimentari e potrebbero rappresentare una soluzione per le persone affette da tali condizioni. Tuttavia è necessaria un'ulteriore ricerca approfondita, preferibilmente di tipo clinico capace magari di valutare anche la combinazione di probiotici e botanicals, prima di poter arrivare ad una reale applicazione terapeutica. Finora la scienza ha ottenuto traguardi soddisfacenti e per questo non si fermerà nel trovare un trattamento per tutti quei soggetti che soffrono di allergia alimentare.

Bibliografia:

- (1) Lucio Capurso (2016), Il microbiota intestinale
- (2) Miller, *et al.* (2021), The longitudinal and cross-sectional heterogeneity of the intestinal microbiota.
- (3) Christian Milani (2017), The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota.
- (4) Aagaard K, *et al.* (2014), The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.*
- (5) Dermobiotica (2018) di Marco Pignatti, edizione Minerva Medica (pag. 14-15).
- (6) F. Mangiola, *et al.* (2018), Gut microbiota and aging.
- (7) Furusawa Y, *et al.* (2013), Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.*
- (8) Immunobiologia di Janeway (2014), 8^a edizione Piccin
- (9) Salutarmente.it
- (10) BiologiaWiki
- (11) Onyinye I. Iweala and Cathryn R. Nagler (2019), Annual Review of Immunology “The microbiome and food allergy”
- (12) C. Lifschitz e H. Szajewska (2015), “Cow's milk allergy: evidence-based diagnosis and management for the practitioner.”
- (13) Dulashi Withanage Dona e Cenk Suphioglu (2020), “Egg Allergy: Diagnosis and Immunotherapy.”
- (14) Gelis S., *et al.* (2020), “Shellfish Allergy: Unmet Needs in Diagnosis and Treatment.”
- (15) Shu, SA., Yuen, AWT, Woo, E. *et al.* (2018) “Microbiota e allergie alimentari.” *Clinica Rev Allerg Immunol.*
- (16) Berin MC. (2021). “Dysbiosis in food allergy and implications for microbial therapeutics.”. *J Clin Invest.*
- (17) Bunyavanich S, Berin MC. (2019). “Food allergy and the microbiome: Current understandings and future directions.”. *J Allergy Clin Immunol.*
- (18) Bao R., *et al.* (2021). “Fecal microbiome and metabolome differ in healthy and foodallergic twins”. *JCI.*
- (19) Yudie Yang, *et al.* (2021). “Advances in the relationships between cow’s milk protein allergy and gut microbiota in infants.” *Frontiers in microbiology.*
- (20) Berni Canani, *et al.* (2015). “La formula integrata con *Lactobacillus rhamnosus* GG espande i ceppi batterici produttori di butirrato nei bambini allergici al cibo.” *ISME J.*
- (21) Berni C., *et al.* (2016). “Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow’s milk allergy: 3-year randomized controlled trial.” *The journal of allergy and clinical immunology.*
- (22) Wei Jing, *et al.*, (2020). “*Bifidobacterium bifidum* TMC3115 migliora l'allergia alle proteine del latte influenzando il microbiota intestinale: uno studio di controllo randomizzato in doppio cieco.”
- (23) Na li, *et al.*, (2020). “*Bifidobacterium breve* M-16V alters the gut microbiota to alleviate OVA-induced food allergy through IL33/ST2 signal pathway.”

- (24) Duan C, *et al.*, (2022). “Oral administration of *Lactobacillus plantarum* JC7 alleviates OVA-induced murine food allergy through immunoregulation and restoring disordered intestinal microbiota.”
- (25) Wenwei Lu, *et al.*, (2022). “Probiotic strains alleviated OVA-induced food allergy in mice by regulating the gut microbiota and improving the level of indoleacrylic acid in fecal samples.”
- (26) Shin HS, *et al.*, (2018). “Preventive Effects of a Probiotic Mixture in an Ovalbumin-Induced Food Allergy Model.” *J. Microbiol. Biotechnol.*
- (27) Fu L., *et al.*, (2017). “*Bifidobacterium infantis* Potentially Alleviates Shrimp Tropomyosin-Induced Allergy by Tolerogenic Dendritic Cell-Dependent Induction of Regulatory T Cells and Alterations in Gut Microbiota.” *Front Immunol.*
- (28) Linglin Fu, *et al.*, (2019). “Yogurt-sourced probiotic bacteria alleviate shrimp tropomyosin-induced allergic mucosal disorders, potentially through microbiota and metabolism modifications.” *Allergology International.*
- (29) Zhao T, *et al.*, (2019). “*Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): una rassegna dei suoi usi tradizionali, botanica, fitochimica, farmacologia e tossicologia.” *Il giornale di farmacia e farmacologia.*
- (30) Kim, *et al.*, (2010). “Composizione erboristica antiallergica di *Scutellaria baicalensis* e *Phyllostachys edulis*”. Thieme.
- (31) Bui., *et al.*, (2017). “Baicalein, wogonin ed estratto di etanolo di *Scutellaria baicalensis* alleviano l'infiammazione allergica delle vie aeree indotta dall'ovalbumina e lo shock anafilattico mediato dai mastociti regolando lo squilibrio Th1/Th2 e il rilascio di istamina.” *AnatCell Biol.*
- (32) Shin HS, *et al.*, (2014) “Preventive effects of skullcap (*Scutellaria baicalensis*) extract in a mouse model of food allergy.” *J Ethnopharmacol.*
- (33) Okada Y, *et al.*, (2012) “Dietary Resveratrol Prevents the Development of Food Allergy in Mice.” *PLoS ONE* 7.
- (34) Kinney SR, *et al.*, (2015). “Curcumin Ingestion Inhibits Mastocytosis and Suppresses Intestinal Anaphylaxis in a Murine Model of Food Allergy.” *PLoS One.*
- (35) Shin HS, *et al.*, (2015). “Turmeric (*Curcuma longa*) attenuates food allergy symptoms by regulating type 1/type 2 helper T cells (Th1/Th2) balance in a mouse model of food allergy.” *J Ethnopharmacol.*
- (36) Ushiroda C, *et al.*, (2022). “Lycopene intake induces colonic regulatory T cells in mice and suppresses food allergy symptoms.” *Pediatr Allergy Immunol.*
- (37) Zhang T, *et al.*, (2020) “Changes in Allergenicity of Ovalbumin *in Vitro* and *in Vivo* on Conjugation with Quercetin.” *J Agric Food Chem.*
- (38) Xu W, *et al.*, (2023). “Synergistic effects of L-theanine and epigallocatechin gallate in alleviating ovalbumin allergy by regulating intestinal immunity through inhibition of mast cell degranulation.” *Food Funct.*
- (39) Lv L, *et al.*, (2021). “Changes in structure and allergenicity of shrimp tropomyosin by dietary polyphenols treatment.” *Food Res Int.*