

Modulazione delle cellule infiammatorie nelle infezioni da elminti

Fabrizio BRUSCHI

Istituto di Patologia Generale, Università di Perugia, Policlinico Montelucre, Perugia

Riassunto. - In questa rassegna vengono presi in esame vari meccanismi con cui gli elminti modulano le attività delle cellule infiammatorie. In particolare, vengono riportati vari esempi di molecole prodotte da parassiti che interagiscono con i linfociti e loro prodotti, quali gli anticorpi, modificando sia la regolazione che la fase effettrice della risposta immunitaria; inoltre vengono analizzati i meccanismi di interferenza con il sistema del complemento. Parassiti come *Ancylostoma caninum* producono fattori in grado di inibire l'adesione dei neutrofili all'endotelio, come il neutrophil inhibitory factor (NIF), mentre la *Trichinella spiralis* produce una glicoproteina, la 45gp, che inibisce varie funzioni dei neutrofili. Inoltre sono prese in esame le interazioni con i monociti-macrofagi, con particolare riguardo alla modulazione della sintesi di NO. Infine, vengono illustrati i vari sistemi antiossidanti, propri dei vari elminti. La comprensione di questi meccanismi di evasione della risposta immune riveste un'importanza notevole per la messa a punto di vaccini efficaci e di nuovi farmaci, oltre a chiarire il contributo dei parassiti all'evoluzione del sistema immune.

Parole chiave: elminti, linfociti, granulociti, monociti, antiossidanti.

Summary (*Modulation of inflammatory cells by parasitic helminths*). - In this review, different mechanisms by which helminthic parasites modulate the activities of inflammatory cells are considered. Examples are presented of parasitic products interfering with lymphocytes and their products such as antibodies, then modifying both regulation and effector response of the immune system. Furthermore, examples of interference on the complement system are illustrated. Parasites such as *Ancylostoma caninum* produce factors such as the neutrophil inhibitory factor (NIF) capable of inhibiting the neutrophil-endothelium adhesion, whereas *Trichinella spiralis* produces a glycoprotein, the 45gp, which inhibits different neutrophil functions. Parasites are also able to modulate the function of the monocytes-macrophages which in some infections play a crucial role; the modulation of NO synthesis is also relevant to the host-parasite relationship. Finally, the different anti-oxidant systems of helminthic parasites are described. The comprehension of such evasion mechanisms of the immune response is necessary to develop vaccines and new drugs, but it is also useful to clarify the contribution of parasites to immune system evolution.

Key words: helminth, lymphocytes, granulocytes, monocytes, anti-oxidants.

Introduzione

Gli agenti infettivi hanno sviluppato un ampio spettro di sistemi che sono il frutto di adattamenti specifici e generali il cui fine è l'evasione della risposta immune dell'ospite. Gli elminti, a differenza dei protozoi, sono caratterizzati dalla bassa velocità di replicazione e dalla localizzazione extracellulare. Per questo motivo, secondo Maizels *et al.* [1] le strategie di difesa usate da questi parassiti si possono dividere in tre tipi: 1) evitare l'induzione iniziale delle risposte immuni potenzialmente dannose; 2) alterare il braccio afferente e quello efferente del sistema immune; 3) disattivare gli attacchi a breve raggio innescati, con vari meccanismi, dalle cellule effettrici.

Per raggiungere i predetti scopi i parassiti liberano particolari molecole che hanno la proprietà di modulare le cellule infiammatorie quali linfociti, monociti-macrofagi e granulociti.

Lo studio dei meccanismi di evasione della risposta immune e delle caratteristiche biologiche dei prodotti parassitari è utile non solo per comprendere meglio i complessi meccanismi di interazione ospite-parassita

che sono il frutto del lungo processo di adattamento dell'agente infettivo con il proprio ospite, ma anche per mettere in atto delle controrisposte dell'ospite nei confronti di questi prodotti così sofisticati, per favorire il controllo di quella particolare malattia parassitaria. Studi recenti mostrano che in particolari modelli di infezione sperimentale, quali quella da *Trichinella spiralis* [2] e da *Ancylostoma caninum* [3], la vaccinazione con alcuni di questi prodotti conferisce una buona protezione nei confronti dell'infezione.

Una miglior comprensione di questi meccanismi di evasione riveste anche un interesse più generale, dal momento che l'estrema selettività di azione di alcune molecole di origine parassitaria sui diversi tipi di cellule infiammatorie, ne fa prevedere un possibile impiego terapeutico in patologie infiammatorie particolarmente gravi. E' stato dimostrato infatti che un prodotto dell'*Ancylostoma*, il cosiddetto NIF (neutrophil inhibitory factor) è in grado di prevenire il danno a carico del polmone causato dai neutrofili, in un modello sperimentale [4] ed ancora riduce l'adesione dei neutrofili nel fegato dopo shock emorragico [5].

Modulazione dei linfociti e dei loro prodotti

I parassiti possono modulare la risposta immunitaria dell'ospite, sia agendo sulla regolazione di quest'ultima, sia bloccando la risposta effettrice.

Come esempio della prima modalità citiamo quello dello *Schistosoma* che causa nei macrofagi degli animali infetti una difettosa presentazione degli antigeni, probabilmente attraverso la gran quantità di glicconiugati prodotti [1]. I nematodi invece secernono la fosforilcolina che potrebbe svolgere la sua azione inibendo i processi di attivazione [1]. Anche la processazione dell'antigene all'interno delle cellule presentanti l'antigene può essere alterata, come avviene nel caso delle infezioni da filarie che producono molecole inibitrici della catepsina B, una proteasi necessaria in questo processo [1]. *Ascaris lumbricoides* produce un inibitore dell'aspartato proteasi che blocca la funzione di presentazione dei linfociti B. La funzione delle cellule T viene inibita da un prodotto del cestode dei roditori *Taenia taeniaeformis*, la taeniastatina, una serina proteasi di 19,5 kD. Questa proteina inibisce la proliferazione delle cellule T di ratto e la produzione di IL-2, oltre ad inibire la proliferazione dei timociti murini indotta da IL-1, in maniera dose-dipendente, senza però alterare la risposta di linee IL-2 dipendenti, alla citochina esogena [6]. Questi dati indicano che l'incapacità di produrre IL-2 potrebbe essere dovuta all'effetto inibitore di proteasi che svolgono un ruolo cruciale nell'attivazione del linfocita oppure alla privazione di un segnale funzionale della IL-2 per la differenziazione cellulare. L'inibizione della generazione di cellule effettrici è senz'altro una modalità di prevenire l'attacco delle cellule effettrici dell'ospite più efficace e meno dispendioso di energia per il parassita che impiega un numero ridotto di molecole come gli inibitori delle proteasi, piuttosto che inibire la funzione delle cellule effettrici, dopo che queste sono state attivate [6].

Le filarie come pure la *Taenia* utilizzano sia l'acido arachidonico endogeno che esogeno per produrre e liberare prostanoidi, cioè derivati della conversione dell'acido arachidonico, grazie all'intervento della ciclossigenasi; di questo enzima nell'uomo si conosce un'isoforma costituzionale ed una inducibile [7]. I parassiti invece producono soltanto la prima forma che determina la produzione di eicosanoidi che agiscono in maniera autocrina, ma che, riversati nel microambiente vicino al parassita, hanno un effetto "down regolatore" sulle cellule infiammatorie ed immunitarie. Per esempio, la prostaglandina PGE2 ha un effetto inibente sulla proliferazione delle cellule T, le funzioni macrofagiche, impedendo al tempo stesso la capacità di risposta delle cellule B [7]. Questi effetti delle prostaglandine potrebbero spiegare, per esempio, l'incapacità di macrofagi e linfociti di eliminare le microfilarie circolanti nella filariosi. Le cercarie di *S. mansoni* metabolizzano rapidamente l'acido linoleico ad arachidonico [8],

penetrano la cute dei mammiferi in risposta alla stimolazione da parte degli acidi grassi esterificati della cute e durante la fase di penetrazione della cute convertono l'acido linoleico ad arachidonico, sintetizzando quindi prostanoidi. Mentre l'azione pro-infiammatoria dei leucotrieni favorirebbe la penetrazione della cute, quella vasodilatante delle prostaglandine favorirebbe gli schistosomuli nel trovare i capillari sanguigni [7]. Anche le larve di *T. taeniaeformis* sono capaci di metabolizzare l'acido arachidonico esogeno e liberare trombossani quali il TXA2 [9] e la PGE2 [10]. Tutti questi dati dimostrano che i parassiti ed in particolare gli elminti producono eicosanoidi, ma il loro ruolo nel rapporto ospite-parassita non è stato ancora chiarito. L'ipotesi più accreditata è quella che gli eicosanoidi sia parassitari che indotti dal parassita deprimano la risposta dell'ospite, inibendo le funzioni macrofagiche e delle cellule T e B. Questi eicosanoidi sono capaci di stimolare una risposta delle cellule T helper che potrebbe influire sulla gravità dell'infezione; per esempio la PGE2 favorisce una risposta di tipo Th2 che nella schistosomiasi come pure nella leishmaniosi per esempio non risulta essere protettiva [11].

E' stata descritta un'inibizione selettiva delle cellule Th1 nella filariosi, in cui, in presenza di uno stato anergico delle cellule T, specifica per l'antigene, si osserva una normale risposta anticorpale [1].

Finora non sono state né isolate, né identificate molecole parassitarie che stimolino la produzione di eicosanoidi. Tuttavia la stimolazione da parte di molecole parassitarie di cellule infiammatorie porta ad una notevole produzione di prostaglandine che svolgerebbero la loro azione localmente, andando a limitare l'attivazione dei macrofagi vergini nei siti di infiammazione con ovvie conseguenze dal punto di vista immunopatologico, comuni a varie malattie parassitarie [7].

Quando i parassiti non interferiscono sulla regolazione della risposta immune possono comunque renderla meno efficace inibendo i prodotti della stessa come gli anticorpi. Sono state descritte infatti varie proteasi di origine elmintica, prodotte per esempio da *Dirofilaria immitis*, *Fasciola hepatica*, *S. mansoni* capaci di scindere le immunoglobuline. *Necator americanus*, produce tra i fattori escreti/secreti (E/S), una proteasi delle IgA che libera dei frammenti Fab bloccanti il complemento o l'attacco fagocitario mediato da IgG o IgM integre.

Le IgA secretorie che rappresentano un forte segnale per la degranulazione degli eosinofili *in vitro* e sono considerate il principale isotipo capace di mediare le funzioni effettrici di queste cellule, possono venir digerite dalle rispettive proteasi parassitarie, in questo modo la degranulazione degli eosinofili stessi che svolgono un ruolo protettivo nei confronti del parassita nell'uomo verrebbe bloccata [12].

Interazione con il sistema del complemento

Gli elminti sono capaci di produrre proteoglicani altamente solfati che attivano il complemento, rendendolo meno disponibile per l'immunocomplesso.

Lo schistosomulo di *S. mansoni* è in grado di attivare il complemento attraverso la via alterna [13], così pure il nematode *Trichinella spiralis* in tutti i suoi stadi è capace di legare la frazione C1q del sistema del complemento ed attivarlo quindi in assenza di anticorpo specifico, senza però che quantitativi significativi di C9 si leghino alla superficie del parassita, facendo ipotizzare la capacità di questo nematode di produrre una sostanza inibente l'assemblaggio e la polimerizzazione del complesso di attacco alla membrana; in questa maniera il parassita eviterebbe il potenziale distruttivo del complemento [14]. La già citata taeniastatina è in grado di inibire la via classica e quella alterna del complemento [15].

Modulazione dei granulociti da prodotti parassitari

Gli elminti liberano fattori che, modulando le funzioni leucocitarie, possono prevenire l'azione di potenziali cellule "killer" [16]. Molti sono gli esempi di tali parassiti che producono fattori con queste azioni, per esempio una proteina ottenuta da *Echinococcus granulosus* che possiede un peso molecolare di 12 kD e rappresenta uno degli antigeni principali del liquido cistico idatideo, rappresentando la più piccola subunità dell'antigene B [17], si è dimostrata capace di inibire l'elastasi, un tipico enzima rilasciato dai neutrofili dopo la degranolazione, a concentrazioni corrispondenti a quelle della proteina nel liquido cistico (10^{-7} M) [18]. Attività anti-proteasi sono state descritte in proteine derivate da altri parassiti, in particolare la taeniastatina prodotta da *T. taeniaeformis* ha in comune con la proteina di *E. granulosus* l'effetto anti-proteasi, in quanto inibisce tripsina e chimotripsina ed inibisce la chemiotassi dei neutrofili [19]. Tuttavia mentre la taeniastatina svolge l'inibizione della chemiotassi grazie all'attività anti-proteasica, la proteina di *E. granulosus* possiede un'attività chemiotattica sua propria [18]. Questa proteina non inibisce la chemiotassi per competizione con il chemioattrattante per il suo recettore, in quanto i chemioattrattanti usati nei test sono il PAF ed il C5a che possiedono recettori distinti sui neutrofili [20]. Sembra quindi che la proteina di *E. granulosus* agisca con un' inibizione da alta dose che porta ad una desensibilizzazione delle cellule.

Anche *Trichinella* produce fattori chemiotattici per i neutrofili. Queste cellule svolgono un ruolo rilevante nel rapporto ospite-parassita dal momento che sono capaci *in vitro* di svolgere un'attività citotossica nei confronti delle larve "newborn" (NBL) in un sistema ADCC (citotossicità cellulare anticorpo-dipendente) con meccanismi che vedremo in seguito, almeno quanto gli

eosinofili [21] se non più dal momento che queste ultime cellule uccidono le NBL di 2 ore di vita, ma non quelle di 20 ore, come fanno invece i neutrofili [22]. *Trichinella* produce anche fattori inibenti la chemiotassi, come è stato dimostrato su cellule umane dove prodotti E/S di larve muscolari sono risultati capaci di inibire la chemiotassi, pur stimolando la chemiocinesi [23] e nelle cellule di topo che, incubate con prodotti E/S di larve muscolari sia di *T. spiralis* che di *T. pseudospiralis*, risultavano inibite, alle più alte concentrazioni usate [24]. Tuttavia questo parassita produce anche fattori chemioattrattanti, in particolare prodotti derivati dagli stadi adulti e da NBL di *T. pseudospiralis* presentano la maggiore attività chemiotattica nei confronti di neutrofili murini. Non solo, i neutrofili provenienti da topi infettati con *T. pseudospiralis* risultano maggiormente responsivi a vari stimoli chemiotattici, paragonati sia a cellule normali che a quelle provenienti da topi infettati da *T. spiralis* [24].

Recentemente è stato dimostrato l'effetto inibitorio di varie funzioni neutrofiliche umane di una glicoproteina prodotta da larve muscolari di *T. spiralis*, di 45 kD, purificata per cromatografia di affinità. Questa proteina si lega ai neutrofili umani ed è capace di ridurre il metabolismo ossidativo della cellula, sia in risposta all'f-MLP (che permette di esplorare una via di attivazione recettore-dipendente), che alla PMA (che attiva la cellula indipendentemente da un legame recettoriale) [25]. Inoltre tale proteina è capace di "down regolare" alla superficie della cellula attivata con f-MLP, il CD11b [26], vale a dire la $\beta 2$ -integrina che lega ICAM-1 (CD54) presente sulla superficie della cellula endoteliale, svolgendo un ruolo chiave nel processo di adesione del neutrofilo all'endotelio [27]. Il gene che codifica per questa proteina è stato clonato [28] e la sequenza dedotta presenta delle regioni di omologia con alcune proteine murine che fanno parte della famiglia delle glicoproteine appartenenti al sistema del complemento.

Come abbiamo già visto, gli elminti sono in grado di produrre sostanze chemioattrattanti per i neutrofili, non solo, ma anche per gli eosinofili, come è stato descritto in *Ascaris* che produce un fattore chemiotattico per neutrofili ed eosinofili [29], *Anisakis* che produce un fattore selettivo per gli eosinofili [30] e a livello dei granulomi epatici di topi infettati da *Schistosoma* [31]. E' stato anche dimostrato che gli schistosomuli di *S. mansoni* producono dei fattori solubili, definiti prodotti derivati dallo *Schistosoma*, con un peso molecolare tra i 25 ed i 65 kD, che non sono chemiotattici per gli eosinofili, ma sono capaci di attivare gli eosinofili sia di ratto che umani, ma non i neutrofili, aumentandone la citotossicità anti-parassitaria IgG-dipendente, come pure l'espressione dei recettori Fc per le IgG e la degranolazione. L'incapacità di questi fattori di attivare i neutrofili potrebbe spiegare l'assenza di citotossicità di queste cellule nei confronti dello schistosomulo [32].

Di probabile origine parassitaria sono i fattori sierici ritrovati nei pazienti affetti da trichinellosi. Questi fattori inibiscono la chemiotassi, la fagocitosi [33], la produzione basale (ma non quella stimolata) di anione superossido (SA), il metabolismo ossidativo valutato come chemiluminescenza in risposta sia all'f-MLP che alla PMA [34]. Nonostante tali sieri abbiano in un'elevata percentuale livelli aumentati di IL-2, una citochina che ha un effetto inibitore della chemiotassi, non è stata osservata una correlazione significativa tra i livelli di questa citochina e l'effetto inibitorio, né sulla chemiotassi, né sul metabolismo ossidativo. Inoltre, non sono stati ritrovati immunocomplessi alla superficie di neutrofili incubati con tali sieri ed in un follow-up a distanza di un anno è stato osservato l'effetto inibitore, sia sulla chemiotassi che sulla fagocitosi, in un'elevata percentuale dei sieri esaminati [35]. Il fatto che anche proteine separate da prodotti E/S di larve muscolari di *T. spiralis* mediante "chromatofocusing", siano in grado di inibire la produzione basale di anione superossido, ma non quella stimolata, in analogia con i sieri dei pazienti, suggerisce la natura parassitaria di questi fattori [34].

Come già accennato, *A. caninum* produce una glicoproteina di 41 kD, denominata NIF [36], che costituisce il ligando naturale del dominio A della $\beta 2$ integrina CR3 (CD11b/CD18), vale a dire il recettore di tipo 3 per il complemento [37] e pertanto inibisce sia l'adesione dei neutrofili all'endotelio, sia la produzione di H_2O_2 , adesione-dipendente, da parte di neutrofili attivati. Il gene che codifica per tale proteina è stato clonato e la sequenza aminoacidica dedotta è costituita da 257 residui aminoacidici, preceduti da una sequenza leader di 17 aminoacidi. La proteina nativa è caratterizzata da dieci cisteine e da sette siti di glicosilazione. Questa proteina che non possiede alcuna omologia di sequenza

con proteine finora conosciute, rappresenta un prototipo di una nuova classe di inibitori delle funzioni leucocitarie [36].

L'azione principale anti-infiammatoria di *Necator americanus* è svolta soprattutto dagli enzimi acetilcolinesterasi, glutatione-S-transferasi (GSH-S-transferasi) e superossido-dismutasi (SOD), dal momento che questo parassita non produce NIF come *A. caninum* che invece non libera all'esterno, né acetilcolinesterasi, né GSH-S-transferasi. La SOD liberata da *N. americanus*, tuttavia, in assenza di catalasi e glutatione perossidasi (GSH-px) nelle secrezioni di questo parassita, genera, per dismutazione dell'anione superossido, perossido di idrogeno e quindi radicali idrossilici, che potrebbero svolgere un'azione tossica nei confronti delle cellule dell'ospite ed in particolare delle cellule infiammatorie, ma non nei confronti del parassita che sarebbe protetto dalla GSH-S-transferasi, presente al suo interno, che è in grado di neutralizzare le citotossine elettrofiliche generate dall'attacco immune [38].

Un quadro riassuntivo dei vari effetti sui granulociti neutrofili di alcuni prodotti di elminti è dato in Tab. 1.

Modulazione dei monociti

Una delle cellule effettrici della risposta immunitaria più efficace nei confronti degli elminti è rappresentata dal macrofago. In particolare questa cellula svolge un ruolo-chiave nella difesa contro il trematode *S. mansoni*, un elminta che rimane in sede extracellulare per gran parte della sua interazione con l'ospite. È stato dimostrato che macrofagi attivati da citochine sono capaci di uccidere lo schistosomulo, vale a dire lo stadio migrante, con meccanismi molto simili a quelli usati da queste cellule

Tabella 1. - Prodotti di parassiti elmintici capaci di modulare le funzioni dei granulociti neutrofili

Parassita	Prodotto	Caratteristiche	Effetto	Referenza
<i>Ancylostoma caninum</i>	NIF	Glicoproteina di 41 kD (ligando del CD11b/CD18)	Inibizione dell'adesione neutrofilo-endotelio e della produzione di H_2O_2 adesione-dipendente	[36]
<i>Echinococcus gnathosomus</i>	Non designato	Antigene di 12 kD presente nel liquido cistico (forma simile ad una parte della teniastatina)	Inibizione dell'elastasi e della chemiotassi	[18]
<i>Taenia taeniaeformis</i>	Taeniastatina	19,5 kD (inibitore della serina proteasi)	Inibizione della chemiotassi	[19]
<i>Trichinella spiralis</i>	45 gp	Glicoproteina di 45 kD (glicosilata con il β -tivelosio)	Inibizione del metabolismo ossidativo, si lega ai neutrofili umani e "down regola" il CD11b di neutrofili attivati	[25]

nei confronti di altri "target" extracellulari, come per esempio le cellule tumorali [39]. L'attivazione di macrofagi peritoneali con IFN- γ e altre citochine induce la produzione arginina-dipendente di nitrossido (NO) che rappresenta la molecola effettrice del "killing" parassitario [40], mentre non sono necessari prodotti del metabolismo ossidativo di queste cellule. I principali bersagli del NO nello *Schistosoma* sono rappresentati da enzimi catalitici contenenti un gruppo cataliticamente attivo Fe-S. A differenza del danno mediato da macrofagi in presenza di anticorpi, quello mediato da macrofagi attivati non è diretto alla superficie del parassita [41].

L'attivazione dei macrofagi in senso citotossico nei confronti del parassita e quindi la produzione di NO, può essere inibita da citochine modulatorie come IL-10, IL-4 e TGF- β , necessarie ad alte concentrazioni singolarmente, ma insieme a bassi livelli, in maniera sinergistica [42, 43].

L'effetto rilevante del NO nei confronti del parassita è stato dimostrato anche *in vivo*.

Anche i parassiti allo stadio polmonare non più giovani sono suscettibili *in vitro* al danno da macrofagi attivati, attraverso la via arginina-dipendente, come pure a NO esogeno [44].

Nei polmoni di topi vaccinati con cercarie irradiate si trova l'espressione aumentata di citochine prodotte da cellule Th1, quali la IL-2, l'IFN- γ , TNF, le quali attivano cellule effettrici producenti NO. Il trattamento con l'aminoguanidina, un inibitore di NO, di animali vaccinati diminuisce marcatamente il livello di resistenza alla infezione secondaria [45].

NO *in vivo* potrebbe essere prodotto non solo dai macrofagi, ma anche da cellule endoteliali che rivestono un ruolo molto importante dal momento che il parassita rimane per lungo tempo in sede intravascolare. Ebbene è stato dimostrato che cellule endoteliali sia murine che umane in coltura sono in grado di uccidere i parassiti mediante una via arginina-dipendente [46].

Come lo *Schistosoma* può sfuggire all'effetto tossico del NO? Passando dal metabolismo aerobico degli stadi liberi ad una forma primariamente dipendente dal metabolismo fermentativo, dopo l'infezione di un mammifero; questo passaggio ridurrebbe la suscettibilità al killing mediato dal NO prodotto da macrofagi attivati [40, 47].

Per quanto riguarda il ruolo di NO nella relazione ospite-parassita bisogna considerare che NO ha un'emivita brevissima e pertanto può agire in stretta vicinanza con il luogo di produzione; ne consegue che il parassita non ha bisogno di sistemi "scavengers" del NO e la dismutazione di anione superossido da parte della SOD fa sì che si prevenga la formazione di radicale idrossilico dall'interazione tra SA e NO, che è responsabile della perossidazione lipidica del parassita stesso [48]. La

reazione tra NO e anione superossido può essere vantaggiosa per l'ospite dal momento che si migliora la capacità citotossica di macrofagi e neutrofili nel combattere agenti infettivi, con la formazione di perossinitrito che ha un'elevata capacità ossidante. La SOD extracellulare (vedi sotto) potrebbe prevenire la formazione di quest'ulteriore agente ossidante, dismutando l'anione superossido in H₂O₂ [49].

Sistemi antiossidanti

I sistemi antiossidanti ritrovati nella maggior parte delle cellule viventi sono rappresentati da enzimi quali la SOD che ha come bersaglio l'anione superossido e la catalasi e la glutatione perossidasi (GSH-px) che scindono l' H₂O₂. Gli enzimi che svolgono un ruolo difensivo nei confronti delle specie reattive dell'O₂ (SRO), prodotte dalle cellule dell'ospite, sono localizzati a livello citosolico, mentre quelli mitocondriali non hanno un ruolo difensivo [50]. Come si vede dalla Tab. 2, gli elminti studiati finora non producono tutti questi tre enzimi in uguali quantità, ma ce ne sono alcuni o degli stadi di essi che ne producono in grandi quantità o non ne producono affatto.

Oltre alla SOD citosolica Cu-Zn ed a quella Mn/Fe mitocondriale, anche gli elminti sono capaci di secernere una Cu/Zn SOD extracellulare [49]; è il caso di *S. mansoni*, *Ascaris*, *Trichinella*, *D. immitis*, *Onchocerca volvulus*, *Brugia pahangi* [49]. La secrezione di una SOD extracellulare implica che questo enzima debba neutralizzare una fonte extracellulare di superossido quale quello prodotto da cellule infiammatorie come fagociti ed in particolare gli eosinofili che sono potenti produttori di anione superossido e di altre specie reattive

Tabella 2. - Enzimi antiossidanti presenti in alcuni elminti (modificata da [50])

	SOD	Catalasi	GSH-Px
<i>Trichinella spiralis</i>	+	-	+
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	+	+	+
<i>Nematospiroides dubius</i>	+	+	+
<i>Onchocerca volvulus</i>	+	nv	nv
<i>Onchocerca cervicalis</i>	+	±	+
<i>Dirofilaria immitis</i>	+	±	+
<i>Taenia taeniaeformis</i>	+	nv	nv
<i>Hymenolepis diminuta</i>	+	-	-
<i>Brugia pahangi</i>	nv	nv	+
<i>Schistosoma mansoni</i>	+	?	+
<i>Caenorhabditis elegans</i>	+	+	+
<i>Fasciola hepatica</i>	nv	-	nv

nv: non valutato.

dell'O₂. Inoltre è stato suggerito che la secrezione di SOD prevenga la formazione di fattori chemiotattici per i neutrofili, prodotti dall'interazione tra O₂⁻ e siero. L'importanza della SOD dei parassiti come difesa nei confronti di ossidanti generati da cellule fagocitarie non ha avuto ancora una dimostrazione sperimentale, infatti non sappiamo quali conseguenze potrebbe avere la deplezione di SOD o di altri enzimi scavengers sulla sopravvivenza *in vivo* di un parassita, ma è facile ipotizzare che in questa maniera sarebbe potenziata l'azione degli eosinofili e/o il reclutamento dei neutrofili [49].

Mediante studi *in vitro* sulla suscettibilità agli effetti delle specie ossidanti, valutata biochimicamente o semplicemente osservando la motilità del parassita, in presenza di queste sostanze, si è potuto determinare la capacità di alcuni elminti di produrre scavengers delle SRO generate *in vitro* con vari sistemi [50].

Uno degli elminti maggiormente studiati a questo riguardo è certamente la *Trichinella spiralis*. Studi *in vitro* di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente hanno dimostrato che lo stadio di adulto e quello di larva infettiva sono più resistenti delle NBL a tale citotossicità mediata da neutrofili ed eosinofili [16]. Ciò potrebbe essere imputabile al basso contenuto di SOD ed all'incapacità di produrre GSH-px da parte dello stadio migrante. Il fatto che i neutrofili di pazienti affetti dalla malattia granulomatosa cronica (caratterizzata da un deficit della NADPH-ossidasi), essendo incapaci di andare incontro al burst respiratorio, in seguito ad una stimolazione della membrana, non siano citotossici nei confronti delle NBL [21], dimostra che il "burst ossidativo" è una componente rilevante della citotossicità dei granulociti nei confronti di *T. spiralis*. Tuttavia anche la perossidasi di eosinofili ed ancor più quella dei neutrofili, in presenza di H₂O₂ e ioni cloruro, sono in grado di uccidere le NBL *in vitro*, attraverso la formazione di acido ipocloroso [51]. Lo studio della protezione dal killing delle NBL, da parte di vari scavengers di specie attive, ha dimostrato che l' H₂O₂, OH[•] e ¹O₂ sono probabilmente coinvolti nel killing delle NBL da parte dei leucociti [52]; l'anione superossido O₂⁻ è tossico indirettamente, dal momento che attraverso la reazione di Haber-Weiss, genera OH[•], reagendo con l' H₂O₂, in presenza di ferro.

Nei nematodi intestinali dei roditori, come *Nippostrongylus brasiliensis* e *Nematospiroides dubius*, la produzione di enzimi antiossidanti è correlata con la capacità di sopravvivere nell'ospite. Infatti, mentre il primo contiene la metà di SOD ed un terzo/un quarto di catalasi, rispetto all'altro parassita, è viene espulso nell'arco di circa due settimane, il secondo, allo stadio adulto, persiste per diversi mesi [50]. Le differenze di suscettibilità sono state confermate tra questi due parassiti anche in test *in vitro* di esposizione a radicali liberi

dell'O₂, in presenza di "scavengers" appropriati. A differenza delle NBL di *T. spiralis*, lo stadio adulto di *N. brasiliensis* è suscettibile all'anione superossido, ma non all' H₂O₂ [50].

Anche le microfilarie di *O. cervicalis* sono sensibili ad ossidanti come l' H₂O₂ e ad altre specie reattive dell'O₂, in ragione dei bassi livelli di catalasi e GSH-px [50].

S. mansoni [53] e *S. japonicum* [54] secernono delle GSH-S-transferasi che sono state localizzate nei vermi adulti di *S. mansoni*, nella parte subtegumentale e non apparentemente associate con il tegumento, fatto questo che non esclude la possibilità di essere secrete, dato che le cellule subtegumentali sono connesse con la superficie [55]. Queste GSH-S-transferasi sono in grado di immunizzare i ratti dopo il "challenge". La loro funzione potrebbe essere quella di proteggere le membrane di superficie dalla lipoperossidazione provocata dalle SRO. A questo proposito è interessante l'osservazione che l'espressione di GSH-px e GSH-S-transferasi e la resistenza agli ossidanti aumentano lungo le varie fasi del ciclo dello *Schistosoma* [1].

Una GSH-S-transferasi di *S. japonicum* è stata clonata e identificata come un bersaglio della risposta immune di topi 129/J che sono relativamente resistenti a questa infezione parassitaria; verso questa proteina questo ceppo di topo produce alti livelli anticorpali [54].

Tra i cestodi, gli adulti di *Hymenolepis diminuta* sono risultati privi di catalasi, GSH-px, ma capaci di produrre SOD. Non si conoscono studi *in vitro* sugli effetti degli ossidanti su questi parassiti [50].

La produzione di antiossidanti da parte degli elminti è più una risposta adattativa a vari tipi di stress, per esempio un aumentato livello del metabolismo aerobio, più che alla risposta dell'ospite, tuttavia è fuor di dubbio che gli enzimi antiossidanti svolgono un ruolo protettivo del parassita nei confronti della produzione di SRO da parte dell'ospite [50], prevenendo l'interazione tra queste specie e la superficie parassitaria che porterebbe alla formazione di idroperossidi dei lipidi, da cui si generano i carbonili citotossici che provocano la morte del parassita [48].

Recentemente è stata clonata una proteina molto rappresentata a livello della superficie di *B. pahangi*, la gp29 che è stata identificata come una proteina simil-perossidasi con attività perossidasi degli idroperossidi lipidici. Questa proteina non è in grado tuttavia di svolgere un'azione detossificante l'H₂O₂, come una vera perossidasi [56].

Ma gli enzimi antiossidanti non si limitano a svolgere un ruolo difensivo. Abbiamo già visto che è stato ipotizzato che la SOD possa svolgere anche un'azione offensiva, danneggiando le cellule infiammatorie, come sembra accadere nel caso dell'infezione da *N. americanus* [38].

Altri fattori

Un'altra modalità con cui i parassiti elmintici interferiscono con la risposta infiammatoria è quella di produrre sostanze che agiscono sui mediatori, per esempio *N. brasiliensis* produce delle acetilidrolasi che scindono/inattivano il fattore attivante le piastrine, PAF [57], capace di stimolare l'effetto citotossico degli eosinofili nei confronti dello schistosomulo di *S. mansoni* [58].

Ancora *S. mansoni* produce un fattore capace di inibire sia *in vitro* che *in vivo* la degranolazione dei mastociti [59].

Conclusioni

In questa rassegna, abbiamo voluto illustrare alcuni esempi di come gli elminti possano influenzare la risposta infiammatoria ed immunitaria dell'ospite, a livello sia molecolare che cellulare, senza voler trattare in modo sistematico le varie infezioni parassitarie.

Dagli esempi riportati possiamo renderci conto che vari elminti hanno messo in opera tutta una serie di meccanismi con cui sono in grado di bloccare la risposta immunitaria dell'ospite, agendo a vari livelli, dalla regolazione di questa alla messa in opera delle risposte effettrici. La comprensione di questi meccanismi di evasione della risposta immune riveste un'importanza notevole per la messa a punto di vaccini efficaci e di nuovi farmaci anti-infiammatori, oltre a chiarire come i parassiti abbiano contribuito alla evoluzione del sistema immune [1].

Ricevuto il 19 maggio 1997.

Accettato il 12 novembre 1997.

BIBLIOGRAFIA

1. MAIZELS, R.M., BUNDY, D.A.P., SELKIRK, M.E., SMITH, D.F. & ANDERSON, R.M. 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* **365**: 797-805.
2. ROBINSON, K., BELLABY, T., CHAN, C. & WAKELIN, D. 1995. High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*. *Immunology* **86**: 495-498.
3. ALI, H.F.B., PRITCHARD, D.I. & STANSSENS, P. 1996. Investigation of a novel hookworm glycoprotein, neutrophil inhibitory factor (NIF), as a potential vaccine candidate against human hookworm infection. (EMOP VII Abstracts). *Parassitologia* **38**: 182.
4. BARNARD, J.W., BIRO, M.G., LO, S.K., OHNO, S., CAROZZA, M.A., MOYLE, M., SOULE, H.R. & MALIK, A.B. 1995. Neutrophil inhibitory factor prevents neutrophil-dependent lung injury. *J. Immunol.* **155**: 4876-4881.
5. BAUER, C., SIAPLAOURAS, S., SOULE, H.R., MOYLE, M. & MARZI, I. 1995. A natural glycoprotein inhibitor (NIF) of CD11b/CD18 reduces leukocyte adhesion in the liver after hemorrhagic shock. *Shock* **43**: 187-92.
6. LEID, R. W., SUQUET, C.M., BOUWER, H.G.A. & HINRICHS, D. J. 1986. Interleukin inhibition by a parasite proteinase inhibitor, Taeniaestatin. *J. Immunol.* **137**: 2700-2702.
7. BELLEY, A. & CHADEE, K. 1995. Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation? *Parasitol. Today* **11**: 327-333.
8. FUSCO, A.C., SALAFSKI, B. & KEVIN, M.B. 1985. *Schistosoma mansoni*. Eicosanoid production by cercariae. *Exp. Parasitol.* **59**: 44-50.
9. LEID, R.W. & CONNEILL, A. 1983. Thromboxane A2 generation by the larval cestode, *Taenia taeniaeformis*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **28**: 67-76.
10. LEID, R.W. & McCONNELL, L.A. 1983. PGE2 generation and release by the larval stage of the cestode *Taenia taeniaeformis*. *Prostaglandins Leukot. Med.* **11**: 317-23.
11. REINER, S.L. 1994. Parasites and T helper cell development: some insights. *Parasitol. Today* **10**: 485-488.
12. PRITCHARD, D.I. 1995. The survival strategies of Hookworms. *Parasitol. Today* **11**: 255-259.
13. SANTORO, F., LACHMANN, P.J., CAPRON, M. & CAPRON, A. 1979. Activation of complement by *Schistosoma mansoni* schistosomula: killing of parasites by the alternative pathway and requirements of IgG for classical pathway activation. *J. Immunol.* **123**: 1551-1557.
14. HONG, Y., KIM, C.W. & GHEBREHIWET, B. 1992. *Trichinella spiralis*: activation of complement by infective larvae, adults and newborn larvae. *Exp. Parasitol.* **74**: 290-299.
15. LEID, R.W. 1988. Parasites and complement. *Adv. Parasitol.* **27**: 131-168.
16. KAZURA, J.W. 1981. Host defense mechanisms against nematode parasites: Destruction of newborn *Trichinella spiralis* larvae by human antibodies and granulocytes. *J. Inf. Dis.* **143**: 712-718.
17. SHEPHERD, J.C. & McMANUS, D.P. 1987. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* **25**: 142-154.
18. SHEPHERD, J.C., AITKEN, A. & McMANUS, D.P. 1991. A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **44**: 81-90.
19. LEID, R.W., GRANT, R.F. & SUQUET, C.M. 1987. Inhibition of equine neutrophil chemotaxis and chemokinesis by a *Taenia taeniaeformis* proteinase inhibitor, taeniaestatin. *J. Immunol.* **9**: 195-204.
20. ALLEN, R.A., TRAYNOR, A.E., OMANN G.M., JESARTIS A.J. 1988. The chemotactic peptide receptor. A model for future understanding of chemotactic disorders. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2**: 33-40.
21. BASS, D.A. & SZEJDA, P. 1979. Eosinophils versus neutrophils in host defense. Killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis* by human granulocytes *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **64**: 1415-1422.

22. VENTURIELLO, S.M., GIAMBARTOLOMEI, G.H. & COSTANTINO, S.N. 1993. Immune killing of newborn *Trichinella larvae* by human leukocytes. *Parasite Immunol.* **15**: 559-564.
23. BRUSCHI, F., CARULLI, G., AZZARA', A., MARINI, A., RUOCCO, L. & AMBROGI, F. 1989. Modulating effects by *Trichinella spiralis sensu stricto* excretory/secretory antigens of human neutrophil functions. *Wiad. Parazytol.* **35**: 391-400.
24. SHUPE, K. & STEWART, G. L. 1991. Stimulated chemotactic response in neutrophils from *Trichinella pseudospiralis*-infected mice and the neutrophilotactic potential of *Trichinella* extracts. *Int. J. Parasitol.* **21**: 625-630.
25. BRUSCHI, F., CARULLI, G., AZZARA', A., HOMAN, W., MINNUCCI, S., SBRANA, S., ANGIOLINI, C. & RIZZUTI-GULLACI, A. 1996. Modulation of human neutrophils by a *Trichinella spiralis* glycoprotein (45 gp). *Eur. J. Haematol.* **57**: S 9.
26. BRUSCHI, F., CARULLI, G., AZZARA', A., HOMAN, W., MINNUCCI, S., RIZZUTI-GULLACI, A., SBRANA, S. & ANGIOLINI, C. 1997. A *Trichinella spiralis* glycoprotein different from NIF modulates the CD11b up-regulation of activated human neutrophils. Proceedings of ICT9, Mexico City. (in stampa).
27. PRIETO, J., BEATTY, P.G., CLARK, E.A. & PATARROYO, M. 1988. Molecules mediating adhesion of T and B cells, monocytes and granulocytes to vascular endothelial cells. *Immunology* **63**: 631-637.
28. VASSILATIS, D.K., DESPOMMIER, D.D., MISEK, D.E., POLVERE, R. I., GOLD, A.M. & van DER PLOEG, L.H.T. 1992. Analysis of a 43-kDa glycoprotein from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J. Biol. Chem.* **267**: 18459-18465.
29. TANAKA, J., BABA, T. & TORISU, M. 1979. *Ascaris* and eosinophils. II. Isolation and characterization of eosinophil chemotactic factor and neutrophil chemotactic factor of parasite in *Ascaris* antigen. *J. Immunol.* **122**: 302-308.
30. TANAKA, J. & TORISU, M. 1978. *Anisakis* and eosinophils. I. Detection of a soluble factor selectively chemotactic for eosinophils in the extract of *Anisakis* larvae. *J. Immunol.* **120**: 745-749.
31. TSUDO, S., FUKUYAMA, K. & EPSTEIN, W.L. 1979. Low molecular weight eosinophil chemotactic factor in granulomatous liver in murine schistosomiasis. *J. Immunol.* **122**: 2554-2557.
32. AURIAULT, C., CAPRON, M. & CAPRON, A. 1982. Activation of rat and human eosinophils by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Cell. Immunol.* **66**: 59-69.
33. BRUSCHI, F., POZIO, E., CARULLI, G., POEIDORI, R. & AZZARA', A. 1990. Inhibition of leukocyte function by serum from patients with trichinellosis. *J. Parasitol.* **76**: 577-579.
34. BRUSCHI, F., CARULLI, G., AZZARA', A. & MINNUCCI, S. 1995. Inhibition of neutrophil oxidative metabolism by trichinellosis patient sera. Parasite origin or host induction? *Parasite Immunol.* **17**: 253-260.
35. BRUSCHI, F., CARULLI, G., POZIO, E. & POLIDORI, R. 1990. Persistence of leukocyte function inhibitory activity in sera of trichinellosis patients at one year of infection. *Bull. Soc. Franc. Parasitol.* **8** (S1): 559.
36. MOYLE, M., FOSTER, D.L., McGRATH, D.E., BROWN, S.M., LAROCHE, Y., DE MUETTER, J., STANSENS, P., BOGOWITZ, C. A., FIED, V. A., ELY, J.A., SOULE, H.R. & VLASUK, G.P. 1994. A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophil function is a ligand of the integrin CD11b/CD18. *J. Biol. Chem.* **269**: 10008-10015.
37. RIEU, P., UEDA, T., HARUTA, I., SHARMA, C.P. & ARNAOUT, M.A. 1994. The A-domain of $\beta 2$ integrin CR3 (CD11b/CD18) is a receptor for the hookworm-derived neutrophil adhesion inhibitor NIF. *J. Cell Biol.* **127**: 2081-2091.
38. BROPHY, P.M., PATTERSON, L.H. & PRITCHARD, D.I. 1995. Offensive secretory SODs. *Parasitol. Today* **11**: 112.
39. ESPARZA, I.D., MANNEL, A., RUPPEL, W., FALK, W. & KRAMMER, P. H. 1987. Interferon γ and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* **166**: 598-594.
40. JAMES, S.L. & GLAVEN, J. 1989. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J. Immunol.* **143**: 4208-4212.
41. JAMES, S.L. 1995. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.* **59**: 533-547.
42. GAZZINELLI, R.T., OSWALD, I.P., JAMES, S.L. & SHER, A. 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN γ -activated macrophages. *J. Immunol.* **148**: 1792-1796.
43. OSWALD, I.P., GAZZINELLI, R.I., SHER, A. & JAMES, S.L. 1992. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor β to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J. Immunol.* **148**: 3578-3582.
44. FOUAD, S., OSWALD, I.P., SHER, A. & JAMES, S.L. 1994. Susceptibility of larval stages of *Schistosoma mansoni* to killing by activated macrophages correlates with parasite metabolic activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 230.
45. WYNN, T.A., OSWALD, I.P., ELTOUM, I.A., CASPAR, P., LOWENSTEIN, C.J., LEWIS, F. A., JAMES, S.L. & SHER, A. 1994. Elevated expression of Th1 cytokines and NO synthase in the lungs of vaccinated mice after challenge infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **153**: 5200-5209.
46. OSWALD, I.P., ELTOUM, I., WYNN, T.A., SCHWARTZ, B., CASPAR, P., PAULIN, D., SHER, A. & JAMES, S.L. 1994. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through production of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 999-1003.
47. SHER, A., JAMES, S. L., SIMPSON, A. J. G., LAZDINS, J. K. & MELT, M.S. 1982. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. III. Loss of susceptibility to macrophage-mediated killing during maturation of *Schistosoma mansoni* schistosomula from the skin to the lung-stage. *J. Immunol.* **128**: 1876-1879.
48. BROPHY, P.M. & PRITCHARD, D.I. 1992. Immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance. *Parasitol. Today* **8**: 419-422.
49. OURY, T.D., DAY, B.J. & CRAPO, J.D. 1996. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab. Invest.* **75**: 617-636.

50. CALLAHAN, H.L., CROUCH, R.K. & JAMES, E.R. 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol. Today* **4**: 218-225.
51. BUYS, J., WEVER, R. & RUITENBERG, E.J. 1984. Myeloperoxidase is more efficient than eosinophil peroxidase in the *in vitro* killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *Immunology* **51**: 601-607.
52. KAZURA, J.W. & MESHNICK, S.R. 1984. Scavenger enzymes and resistance to oxygen mediated damage to *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **10**: 1-10.
53. TAYLOR, J. B., VIDAL, A., TORPIER, G., MEYER, D.J., ROITSCH, C., BALLOUL, J.-M., SOUTHAN, C., SONDERMEYER, P., PEMBLE, S., LECOQ, J.-P. & CAPRON, A. 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* **7**: 465-472.
54. SMITH, D.B., DAVERN, K.M., BOARD, P.G., TIU, W.V., GARCIA, E.G. & MITCHELL, G.F. 1986. Mr 26,000 antigen of *Schistosoma mansoni* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite Glutathione-S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8703-8707.
55. HONG, Z., LOVERDE, P.T., THAKUR, A., HAMMARSKJOLD, M.L. & REKOSH, D. 1993. *Schistosoma mansoni*: a Cu/Zn superoxide dismutase is glycosylated when expressed in mammalian cells and localizes to a subtegumental region in adult Schistosomes. *Exp. Parasitol.* **76**: 101-114.
56. COOKSON, E., BLAXTER, M.L. & SELKIRK, M.E. 1992. Identification of the major soluble cuticular glycoprotein of lymphatic filarial nematodes parasites (gp 29) as a secretory homolog of Glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5837-5841.
57. BLACKBURN, C.C. & SELKIRK, M.E. 1992. Inactivation of platelet-activating factor by a putative acetylhydrolase from the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* **75**: 41-46.
58. MOQBEL, R., WALSH, G.M., NAGAKURA, T., MACDONALD, A.J., WARDLAW, Y., IIKUA, Y. & KAY, A.B. 1990. The effect of platelet-activating factor on IgE binding to, and IgE-dependent biological properties of human eosinophils. *Immunology* **70**: 251-260.
59. MAZINGUE, C., CAMUS, D., DESSAINT, J.P., CAPRON, M. & CAPRON, A. 1980. *In vitro* and *in vivo* inhibition of mast cell degranulation by a factor from *Schistosoma mansoni*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **63**: 178-185.