

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA AVANZATA

Indirizzo: Sistematica Molecolare

XXVII CICLO

**Ruolo protettivo del polisaccaride A (PSA) di
Bacteroides fragilis nei confronti di stati infiammatori
indotti da *Bartonella henselae***

**Protective role of *Bacteroides fragilis* polysaccharide A
(PSA) against inflammation induced
by *Bartonella henselae***

Tutor
Ch.ma Prof.ssa Maria Consiglio Grimaldi

Candidato
Dr. Raimondo Cerciello

Co-Tutor
Ch.ma Prof.ssa Bice Avallone

Coordinatore
Ch.mo Prof. Luciano Gaudio

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

Abstract	1
Sinossi	5
Abbreviazioni e acronimi	9

CAPITOLO 1 - Bacteroides fragilis e il polisaccaride A

1.1 Bacteroides fragilis	12
1.1.1 Caratteristiche nutrizionali	15
1.1.2 Metabolismo energetico	15
1.2 Polisaccaride A	16
1.2.1 Ruolo del PSA nello sviluppo del sistema immunitario	18
1.2.2 Presentazione dell'antigene PSA	19
1.2.3 Immunità innata e il PSA	19
1.2.4 Prevenzione di malattie infiammatorie intestinali e ruolo anti-infiammatorio del PSA	21
1.2.5 Effetti sistemici del PSA	24

CAPITOLO 2 - Bartonella henselae e bartonellosi

2.1 Bartonella henselae	26
2.1.1 Ciclo vitale e strategia di infezione	28
2.1.2 Evasione della risposta immunitaria e immunomodulazione	34
2.2 Bartonellosi	37
2.2.1 Malattia da graffio di gatto	37
2.2.2 Angiomatosi bacillare	40
2.2.3 Peliosi epatica	42

CAPITOLO 3 - Scopo della ricerca e modelli sperimentali

3.1 Scopo della ricerca	44
3.2 Modelli sperimentali	45
3.2.1 <i>Mus musculus</i>	45
3.2.2 Topo SCID	47
3.2.3 Cellule progenitrici endoteliali	48
3.3 Organi modello	55
3.3.1 Fegato	55
3.3.2 Aorta	60

CAPITOLO 4 - Materiali e metodi

4.1 Ceppi batterici e condizioni di crescita	64
4.2 Ceppi murini e modalità di infezione	64
4.2.1 Infezione dei topi C57BL/6J	65
4.2.2 Infezione dei topi SCID	66
4.3 Microscopia ottica	67
4.3.1 Trattamento per l'inclusione in paraffina	67
4.3.2 Taglio	68
4.3.3 Colorazione emallume/eosina	69
4.3.4 Acquisizione delle immagini	70
4.4 Microscopia elettronica a trasmissione	70
4.4.1 Trattamento per l'inclusione in resina	70
4.4.2 Sezionamento	72
4.4.3 Contrasto	73
4.4.4 Acquisizione delle immagini	74
4.5 Nested PCR	74
4.5.1 Estrazione del DNA	75

4.5.2	Amplificazione mediante PCR	76
4.6	Numero di EPC in topi infetti	77
4.7	Isolamento e infezione delle EPC in vitro	78
4.7.1	Isolamento e coltura delle cellule	78
4.7.2	Infezione in vitro	79
4.7.3	Microscopia confocale a scansione laser	80
4.7.4	Microscopia elettronica a trasmissione	80
4.8	Isolamento dell'RNA e saggio quantitativo Real Time PCR	82
4.9	Misura delle citochine dal surnatante delle colture cellulari	83

CAPITOLO 5 - Risultati: parte I

5.1	Effetti del PSA in <i>Mus musculus</i>	84
5.1.1	Nested PCR	84
5.1.2	Analisi morfologica	84
5.1.3	Analisi ultrastrutturale	86

CAPITOLO 6 - Risultati: parte II

6.1	Effetti del PSA in topo SCID	96
6.1.1	Analisi morfologica	96
6.1.2	Analisi ultrastrutturale	100

CAPITOLO 7 - Risultati: parte III

7.1	Effetto del PSA sulle EPC	107
7.1.1	Numero di EPC nei topi infetti	107
7.1.2	Immunofluorescenza	109
7.1.3	Analisi ultrastrutturale	112
7.1.4	Analisi molecolare di chemochine e citochine infiammatorie	115
7.1.5	Quantificazione di chemochine e citochine infiammatorie secrete	117

CAPITOLO 8 - Discussioni e conclusione

8.1 Evidenze del ruolo del PSA in <i>Mus musculus</i>	119
8.2 Evidenze del ruolo del PSA in topi SCID	120
8.3 Evidenze del ruolo del PSA in EPC	121
8.4 Conclusione	124

BIBLIOGRAFIA	I - XVIII
---------------------------	------------------

ABSTRACT

Bacteroides fragilis is an anaerobic bacterium, Gram-negative and it is less than 1% of the human intestinal microflora. In *B. fragilis* were identified eight different capsular polysaccharides, including the polysaccharide A (PSA).

The PSA belongs to a bacterial carbohydrates class known as zwitterionic polysaccharides (ZPS). These polysaccharides are formed by repeating units each having a positive and a negative charge that confer to the molecule immunomodulatory properties. In fact these polysaccharides are the only carbohydrate capable to stimulate an immune response by T cells (Tzianabos AO et al., 2000). The PSA has immunoregulatory properties proven by various studies, in particular, is able to give protection against experimentally induced colitis with *Helicobacter hepaticus* or chemically with TNBS (Mazmanian SK et al., 2008).

The PSA must be processed by endocytic via and presented by MHCII in a similar way as presented antigenic peptides (Watts C. et al., 1999) to induce an immune response. It was shown that the main PSA presenting cells are both plasmacytoid (pDC) (Dasgupta, S. et al., 2014) and conventional (Mazmanian SK et al., 2005) dendritic cells. *B. fragilis*, however, does not adhere to its target cell but is able to release the PSA in outer membrane vesicles (OMVS) (Y. Shen et al., 2012). These vesicles are recognized, on the dendritic cells surface, by the specific receptors Toll-like receptor 2. In addition, the T cells activation requires, on the DC surface, the presence of HLA-DR and co-stimulatory molecules CD86 and ICOSL, that bind respectively CD28 and ICOS on CD4⁺ T cells. The naive CD4⁺ T cells recognize PSA presented by MHCII through their TCR and differentiate into CD4⁺CD45⁺RB^{low} memory T cells that produce the anti-inflammatory cytokine IL-10 (S. Dasgupta et al., 2014).

When there is a break in the intestinal barrier many bacteria, including *B. fragilis*, are poured into the peritoneal cavity. Th17 cells secrete IL-17, which is essential for the abscess formation. Macrophages interact with *B. fragilis* and secrete IL-10 required for the disease containment since it is known that this cytokine inhibits the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α and GM-CSF.

This study tends to make additional knowledge on the relationship between commensal organisms and the host immune system, and to identify whether the PSA can be an

immunomodulatory molecule with clinical relevance. In particular, I evaluated the possible improvements that can make the PSA against chronic inflammatory states such as those induced by pathogenic Gram negative bacterium *Bartonella henselae*, in other sites than the gut.

For this purpose in the first step of my work I have conducted morphological, ultrastructural and molecular studies on mice immunocompetent C57BL/6J aorta and liver samples. I compared the tissue taken from a control group with those isolated from mice subjected to five different treatments. Mice were infected with the wild-type strain of *B. fragilis* NCTC9343, with the mutant strain *B. fragilis* Δ PSA that does not express PSA, with *B. henselae* ATCC49882 or co-infected with *B. henselae* and, or the wild type or mutant strains of *B. fragilis*. *B. henselae* was administered intraperitoneally one week after the oral administration of *B. fragilis*. The organs were collected 36 days after infection with *B. henselae*.

Morphological analysis performed by hematoxylin-eosin staining and ultrastructural analysis by transmission electron microscopy (TEM) showed the presence in mice infected with *B. henselae* of granuloma in the liver and immune system cells in the adventitia of aorta, and the absence in mice co-infected with *B. fragilis* WT of marked inflammatory response, confirming the protective effect played by PSA of *Bacteroides*. As further confirmed by a weaker inflammatory response in mice co-infected with *B. fragilis* Δ PSA.

In the second part of my work, I have carried out further morphological and ultrastructural investigation on SCID mice liver and aorta samples subject to the same treatment of immunocompetent mice. This mice have a severe combined immune deficiency and they are totally deprived of B and T lymphocytes for early lymphocyte maturation block by bone marrow precursors. This in order to evaluate the effects of infection and the possible protective role of PSA in immunodeficiency condition, condition that is a concomitant cause of death in immunocompromised humans infected with *B. henselae* (Chiaraviglio L. et al., 2010).

The morphological studies of liver stained with toluidine blue and ultrastructural analysis by TEM showed that SCID mice tolerate infection by *B. henselae* at high concentrations. The SCID mouse, responds to infection by *B. henselae* with a significant collagen deposition that allows the body to contain the bacteria even though it offers the same a protected environment where avoid digestion by the immune response. In samples infected with *B.*

fragilis WT, however, is noticed the reduction in the production of collagen and increased response by macrophages demonstrating that in immunocompromised condition PSA stimulates the proliferation and activation of innate immune cells able to contain the damage induced by infection with *B. henselae*.

In the last part of my project, I conducted a series of studies on endothelial progenitor cells (EPC) that are infected and are a primary niche for *B. henselae* (Salvatore P. et al. 2008). Initially, It was evaluated by FACS if the number of EPC was influenced by bacterial infections both in immunocompetent mice than in those immunocompromised. In immunocompetent mice infected by *B. henselae* the number of EPC drastically decreases about 90% compared to the number of control mice EPC. Decreased surprisingly counteracted by PSA because the number of EPC increases only in samples co-infected or infected by *B. fragilis* WT.

The same analysis carried out on the immunocompromised mice blood, have shown, however, an increase of EPCs in samples infected by *B. henselae* compared to controls, in addition, also in this case, in samples infected and even more in those co-infected by *B. fragilis* WT. The increase of EPC in response to *B. henselae* in immunocompromised mice, could be due to a greater supply of endothelial precursors essential to ensure that it is secured turnover of damaged endothelial cells by *B. henselae* infection.

The immunofluorescence with anti- *B. fragilis* lipopolysaccharide (LPS) and anti-*B. henselae* showed that *B. fragilis* WT and his mutant Δ PSA can be internalized by the EPC as previously documented for *B. henselae* (Salvatore P et al., 2008), showing that this process is independent from the PSA.

The immunofluorescence data were also confirmed by TEM performed on human EPC cell cultures subjected to the same treatments of infectious mice for 48 hours. Micrographs revealed that *B. fragilis* WT and Δ PSA can infect EPC coming, however, digested within the lysosomes and, furthermore, in co-infections with *B. fragilis* WT, it was observed a reduced number of invasomi compared the cells infected by *B. henselae* alone, as if the bacteria had difficulty duplicating within these cells.

Viewing the main inflammatory profile of 84 genes coding for chemokines, cytokines and their receptors by RT² Profiler PCR Arrays, in both co-infections with either *B. fragilis* WT and *B. fragilis* Δ PSA respect to the simple infection with *B. henselae*, there is an increase in the number of differentially expressed genes (DE) compared to uninfected cells. Particularly, the direct comparison of the expression levels in samples co-infected revealed that *B. fragilis* WT

exerts a significant pro-inflammatory chemokines down-regulation simultaneously providing a positive anti-inflammatory genes modulation such as IL-10 and interferon alpha 2 (IFN- α 2). Finally, ELISA performed on the same infected cells supernatants shows that in samples co-infected, *B. fragilis* WT exerts a significant pro-inflammatory interleukins down-modulation and, on the contrary, a positive increase of IL-10, TNF α and GM-CSF. This data confirmed that the early EPC can play an essential role in the immune response when stimulated by PSA.

PSA has, therefore, a protective role against chronic inflammation induced by *B. henselae*. This molecule exerts its anti-inflammatory role stimulating the IL-10 release by T cells not only in the intestine but also systemically. It also stimulates in immunocompromised patients the innate immune response either through activating macrophages, both stimulating EPC cells, in which it is seen that, they release cytokines *in vitro* when stimulated by PSA, such as GM-CSF, which lead to a further proliferation of macrophages.

These preliminary results suggest that the PSA could start to be used for clinical trials in order to develop innovative therapies against chronic inflammatory diseases.

SINOSSI

Bacteroides fragilis è un batterio anaerobio, Gram-negativo e costituisce meno dell'1% della microflora intestinale umana. In *B. fragilis* sono stati individuati otto differenti polisaccaridi capsulari, tra cui il polisaccaride A (PSA).

Il PSA appartiene ad una classe di carboidrati batterici noti come polisaccaridi zwitterionici (ZPS). Tali polisaccaridi sono caratterizzati dall'essere costituiti da unità ripetute presentanti ognuna una carica positiva ed una negativa che conferiscono alla molecola proprietà immunomodulatorie. Questi polisaccaridi, infatti, sono gli unici carboidrati capaci di stimolare una risposta immunitaria da parte dei linfociti T (Tzianabos A.O. et al., 2000). Il PSA presenta proprietà immunoregolatorie provate da vari studi, in particolare è in grado dare protezione dalla colite indotta sperimentalmente con *Helicobacter hepaticus* o chimicamente con il TNBS (Mazmanian S.K. et al., 2008).

Per indurre una risposta immunitaria, il PSA deve essere processato tramite la via endocitica e presentato da un MHCII in maniera analoga a come sono presentati i peptidi antigenici (Watts C. et al., 1999). E' stato dimostrato che le principali cellule che presentano il PSA sono le cellule dendritiche sia plasmacitoidi (pDC) (Dasgupta S. et al., 2014) che convenzionali (Mazmanian S.K. et al., 2005). *B. fragilis* non aderisce però alla sua cellula bersaglio ma è in grado di rilasciare il PSA in vescicole di membrana all'esterno (OMVs) (Shen Y. et al., 2012). Tali vescicole sono riconosciute, sulla superficie delle cellule dendritiche, da recettori specifici ovvero i Toll-like receptor 2. Inoltre, l'attivazione di cellule T richiede la presenza di HLA-DR e molecole co-stimolatorie ICOSL e CD86 sulla superficie delle DC, che si legano rispettivamente a ICOS e CD28 sulle cellule T CD4⁺. Le cellule T CD4⁺ vergini riconoscono il PSA presentato da MHCII tramite il loro TCR e si differenziano in cellule T di memoria CD4⁺CD45⁺RB^{low} che producono la citochina anti-infiammatoria IL-10 (Dasgupta S. et al., 2014).

Quando si ha una rottura della barriera intestinale molti batteri, tra cui *B. fragilis*, si riversano nella cavità peritoneale. Le cellule Th17 secernono IL-17 che è essenziale per la formazione dell'ascesso. I macrofagi interagiscono con *B. fragilis* e secernono IL-10 necessaria per il contenimento della malattia in quanto è noto che tale citochina inibisce la sintesi di citochine pro-infiammatorie quali IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α e GM-CSF.

Questo studio tende ad apportare ulteriori conoscenze sull'intricata relazione, tra gli organismi commensali e il sistema immunitario dell'ospite e a identificare se il PSA possa essere una molecola immunomodulatoria con rilevanza clinica. In particolare ho valutato l'eventuale miglioramento che il PSA può apportare nei confronti di stati infiammatori cronici come quelli indotti dal batterio patogeno Gram negativo *Bartonella henselae*, in siti diversi da quello intestinale.

A tal fine nella prima fase del mio lavoro ho condotto indagini morfologiche, ultrastrutturali e molecolari su campioni di aorta e di fegato di topi immunocompetenti C57BL/6J. Ho confrontato i tessuti prelevati da un gruppo di controllo con quelli isolati da topi sottoposti a cinque differenti trattamenti. I topi sono stati infettati con il ceppo selvatico di *B. fragilis* NCTC9343, con il ceppo mutante *B. fragilis* Δ PSA che non esprime il PSA, con *B. henselae* ATCC49882 o co-infettati con *B. henselae* e, o il ceppo selvatico o il ceppo mutante, di *B. fragilis*. *B. henselae* è stata somministrata per via intraperitoneale una settimana dopo la somministrazione per via orale di *B. fragilis*. Gli organi sono stati prelevati 36 giorni dopo l'infezione con *B. henselae*.

Le analisi morfologiche eseguite tramite colorazione con ematossilina-eosina e l'analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) hanno evidenziato la presenza nei topi infettati con la sola *B. henselae*, di granulomi nel fegato e di cellule del sistema immunitario nell'avventizia dell'aorta e l'assenza nei topi co-infettati con *B. fragilis* di risposta infiammatoria marcata, confermando l'effetto protettivo svolto dalla molecola di PSA del *Bacteroides*. Dato ulteriormente confermato da una risposta infiammatoria più debole nei topi co-infettati con *B. fragilis* Δ PSA.

Nella seconda parte del mio lavoro ho effettuato ulteriori indagini morfologiche e ultrastrutturali su campioni di fegato e aorta di topi SCID, cioè topi con grave deficienza immunitaria combinata privi totalmente di linfociti B e T per blocco precoce della maturazione linfocitaria dai precursori midollari, sottoposti ai medesimi trattamenti dei topi immunocompetenti. Ciò al fine di valutare gli effetti delle infezioni e l'eventuale ruolo protettivo del PSA anche in condizione di immunodeficienza, condizione questa importante essendo l'infezione da *B. henselae* concausa di morte in esseri umani immunocompromessi (Chiaraviglio L. et al., 2010).

Le indagini morfologiche su sezioni fini di fegato colorate con blu di toluidina e le analisi ultrastrutturali al TEM evidenziano che i topi SCID tollerano l'infezione da *B. henselae* a

elevate concentrazioni. Il topo SCID, risponde all'infezione da *B. henselae* con una notevole deposizione di collagene che permette all'organismo di contenere i batteri, anche se offre agli stessi un ambiente protetto dove evitare la digestione da parte della risposta immunitaria. Nei campioni infettati da *B. fragilis* WT si è notato invece la riduzione nella produzione di collagene e una maggiore risposta da parte dei macrofagi dimostrando che in condizione di immunocompromissione il PSA stimola la proliferazione e attivazione di cellule dell'immunità innata riuscendo a contenere i danni indotti dall'infezione da *B. henselae*.

Nell'ultima parte del mio progetto ho effettuato una serie di indagini su cellule progenitrici endoteliali (EPC) che vengono infettate e risultano una nicchia primaria di *B. henselae* (Salvatore P. et al. 2008). Si è inizialmente valutato tramite FACS se il numero di EPC viene influenzato dalle infezioni batteriche sia nei topi immunocompetenti sia in quelli immunocompromessi. Nei topi immunocompetenti infettati da *B. henselae* il numero di EPC diminuisce drasticamente di circa il 90% rispetto al numero di EPC dei topi controllo. Diminuzione sorprendentemente contrastata dal PSA dato che il numero di EPC aumenta nei soli campioni infettati o co-infettati da *B. fragilis* WT.

Le stesse analisi condotte sul sangue di topi immunocompromessi, hanno evidenziato, invece, un aumento delle EPC nei campioni infettati da *B. henselae* rispetto ai controlli, oltre che, anche in questo caso, nei campioni infettati e ancora di più in quelli co-infettati con *B. fragilis* WT. L'aumento di EPC in risposta all'infezione da *B. henselae* nei topi immunocompromessi, potrebbe essere dovuto a un maggiore apporto di precursori endoteliali essenziali per far sì che venga assicurato il turn over delle cellule endoteliali danneggiate dall'infezione con *B. henselae*.

L'immunofluorescenza con anticorpi specifici anti-lipopolisaccaride di *B. fragilis* (LPS) e anti-*B. henselae* ha mostrato che sia *B. fragilis* WT che il suo mutante Δ PSA possono essere internalizzati dalle EPC come precedentemente documentato per *B. henselae* (Salvatore P et al., 2008) dimostrando che tale processo è indipendente dal PSA.

I dati di immunofluorescenza sono stati confermati anche dalle osservazioni al TEM effettuate su colture cellulari di EPC umane sottoposte agli stessi trattamenti infettivi dei topi per 48 ore. Dalle micrografie è emerso che i *B. fragilis* sia WT sia Δ PSA riescono a infettare le EPC venendo però digeriti all'interno dei lisosomi e, inoltre, nelle co-infezioni con il *B. fragilis* WT, si è osservato un numero ridotto di invasori rispetto alle cellule infettate

dalla sola *B. henselae*, come se il batterio avesse difficoltà a duplicarsi all'interno di queste cellule.

Tramite RT² Profiler Array PCR e visualizzando contemporaneamente il profilo di 84 principali geni infiammatori codificanti chemochine, citochine e i loro recettori, in entrambe le co-infezioni sia con *B. fragilis WT* sia *B. fragilis ΔPSA* rispetto alla semplice infezione con *B. henselae* si è registrato un aumento del numero di geni differenzialmente espressi (DE) rispetto alle cellule non infette. In particolare, il confronto diretto dei livelli di espressione nei campioni co-infettati ha rivelato che *B. fragilis WT* esercita una significativa down-regolazione di chemochine pro-infiammatorie fornendo contemporaneamente una positiva modulazione di geni anti-infiammatori come IL-10 e Interferone-alfa 2 (IFNA2).

Infine tramite test ELISA effettuato sui surnatanti delle stesse cellule infette risulta che nei campioni co-infettati il ceppo di *B. fragilis WT* esercita una significativa sotto modulazione di interleuchine pro-infiammatorie e, al contrario, un incremento positivo di IL-10, di TNF α e GM-CSF. Questo dato ha confermato che le early EPC possono svolgere un ruolo essenziale nella risposta immunitaria se stimulate dal PSA.

Il PSA ha, quindi, un ruolo protettivo nei confronti dell'infiammazione cronica indotta da *B. henselae*. Tale molecola esercita il suo ruolo anti-infiammatorio stimolando il rilascio di IL-10 da parte di cellule T non solo a livello intestinale ma anche a livello sistemico. Inoltre stimola nei soggetti immunocompromessi la risposta immunitaria innata sia attivando macrofagi, sia stimolando cellule EPC, le quali si è visto che, *in vitro*, rilasciano se stimulate dal PSA citochine, quali GM-CSF, che portano a un'ulteriore proliferazione di macrofagi.

Questi risultati preliminari ottenuti inducono a pensare che il PSA possa iniziare a essere utilizzato per trials clinici al fine di sviluppare innovative terapie nei confronti di malattie infiammatorie croniche.

ABBREVIAZIONI E ACRONIMI

ZPS	Polisaccaride Zwitterionico
MHCII	Complesso Maggiore di Istocompatibilità di tipo II
PSA	Polisaccaride A
Mpi	Invertasi del promotore multiplo
PSC	Polisaccaride C
IL-4	Interleuchina 4
IFN-γ	Interferone γ
MLN	Linfonodo Mesenterico
DC	Cellula Dendritica
TLR	Toll Like Receptor
APC	Cellula Presentante l'Antigene
NO	Ossido Nitrico
TNF-α	Fattore di Necrosi Tumorale α
IL-12	Interleuchina 12
CCR7	Recettore della Chemiochina di tipo 7
T_H1	Cellula T helper 1
T_H2	Cellula T helper 2
PDC	Cellula Dendritica Plasmacitoide
IBD	Malattia Infiammatoria Intestinale
T_H17	Cellula T helper 17
IL-1β	Interleuchina 1 β
IL-23	Interleuchina 23
IL-10	Interleuchina 10
TNBS	2,4,6 Acido Trinitrobenzenesulfonico
IL-17	Interleuchina 17
CFSE	Carbossi Fluoresceina Succinimidil Estere

BadA	Adesina A di Bartonella
TAA	Adesina Trimerica Autotrasportante
BCV	Vacuoli contenenti Bartonella
HUVEC	Cellula Endoteliale della Vena Ombelicale Umana
HIF-1	Fattore Inducente Ipossia 1
VEGF	Fattore di Crescita Endoteliale Vascolare
IL-1	Interleuchina 1
PAMP	Profilo Molecolare Associato al Patogeno
LPS	Lipopolisaccaride
EPC	Cellula Progenitrice Endoteliale
AIDS	Sindrome Immunodeficienza Acquisita
CSD	Malattia da Graffio di Gatto
EIA	Saggio Immuno-Enzimatico
FIA	Saggio Immuno-Fluorescenza
TMP	Trimetroprim
SMX	Sulfametoxazolo
DNA-PK	Proteina Chinasi DNA dipendente
DSB	DNA a doppio filamento
RAG	Gene Attivante la Ricombinazione
SCID	Grave Deficienza Immunitaria Combinata
Ab	Anticorpo
HSC	Cellula Staminale Ematopoietica
VEGFR	Recettore del Fattore di Crescita Endoteliale
eNOS	Ossido Nitrico Sintetasi Endoteliale
ac-LDL	Lipoproteina Acetilata a basso peso molecolare
EC	Cellula Endoteliale
MAPC	Cellula Progenitrice Adulta Multipotente
MMP-9	Metalloproteinasi 9

G-CSF	Fattore Stimolante le colonie Granulocitarie
GM-CSF	Fattore Stimolante le colonie Granulocito/Monocitarie
SDF-1	Fattore di Derivazione Stromale 1
FGF	Fattore di Crescita Fibroblastica
BM	Midollo Osseo
ECM	Matrice Extracellulare
MCP-1	Proteina Chemiotattica per i Monociti 1
PPAR	Recettori della Proliferazione Perossisomiale
NK	Natural Killer
SPF	Libero da patogeni specifici
TSB	Brodo di Soia Triptico
PFA	Paraformaldeide
PBS	Buffer Fosfato Salino
EtOH	Etanolo
TAE	Tampone Tris-Acetato-EDTA
Sca-1	Proteina ancorata al Fosfatidilinositolo 1
FITC	Fluoresceina Isotiocianato
FLK-1	Chinasi Epatica Fetale 1
PE	Ficoeritrina
PBMC	Cellula Mononucleata del Sangue Periferico
MOI	Molteplicità di Infezione
TRITC	Isotiocianato Tetrametilrodamina
HPRT	Ipxantina-Guanina Fosforibosiltransferasi
INFA2	Interferone A2

CAPITOLO 1

Bacteroides fragilis e il polisaccaride A

1.1 Bacteroides fragilis

Bacteroides fragilis è un bacillo Gram-negativo, anaerobio obbligato, provvisto di capsula, saprofita nell'intestino (circa 0,5% della flora fecale), nel tratto genitale e nell'oro-faringe dell'uomo. È stato isolato anche da vitelli e agnelli (Myers L.L. and Shoop D.S., 1987) e per tal motivo è ritenuto un indicatore di inquinamento fecale. Il genoma è lungo 5.2 Mb e sono stati dimostrati come meccanismi di scambio genico sia la coniugazione, sia la trasformazione sia la trasduzione mediata da batteriofago.

L'involucro cellulare di *B. fragilis* è una struttura particolarmente complessa consistente di più strati, con subunità di uno strato che sporgono attraverso l'altro (Pumbwe L. et al., 2006). È la specie più diffusa e il più diffuso patogeno umano del genere *Bacteroides*.

B. fragilis possiede fimbrie peritriche (Oyston P. et al., 1991), pili e adesine (fig. 1.1), inoltre secreta lipoproteine con un dominio a foglietto β N-terminale con cui può aderire alla mucosa intestinale (Babu M. et al., 2006). Una glicoproteina di superficie di *B. fragilis*, inoltre, è implicata nel legame a una delle laminine che fanno parte della matrice extracellulare che sottende le cellule epiteliali, endoteliali e circonda le cellule del tessuto connettivo (de O. Ferreira E. et al., 2006).

B. fragilis caratteristicamente rilascia numerose vescicole dalla membrana esterna. Tali vescicole appaiono in microscopia elettronica a trasmissione come vescichette (blebs) di superficie e vescicole extracellulari distaccate (Patrick S. et al., 1996). La grande quantità di vescicole di membrana esterna contenenti principalmente enzimi prodotte da *B. fragilis* suggerisce che questo può essere un importante meccanismo di esportazione di molecole prodotte dal batterio (Cerdeno-Tarraga A.M. et al., 2005). Il genoma di *B. fragilis* contiene anche un gran numero di geni omologhi a una varietà di pompe del sistema di efflusso le cui funzioni di esportazione non sono ancora state definite (Gibson S.A. et al., 1988).

B. fragilis è anche in grado di rilasciare una batteriocina, ovvero una sostanza chimica antibatterica a cui è resistente, ma che rappresenta molto probabilmente un meccanismo

con il quale riduce la concorrenza con gli altri ceppi batterici che occupano la sua stessa nicchia ecologica (Avelar K.E. et al., 1999).

Nell'intestino *B. fragilis* contribuisce a funzioni fisiologiche quali la digestione dei polisaccaridi, il ciclo dell'azoto, il metabolismo dell'acido biliare e ha un ruolo fondamentale nello sviluppo dello stesso intestino.

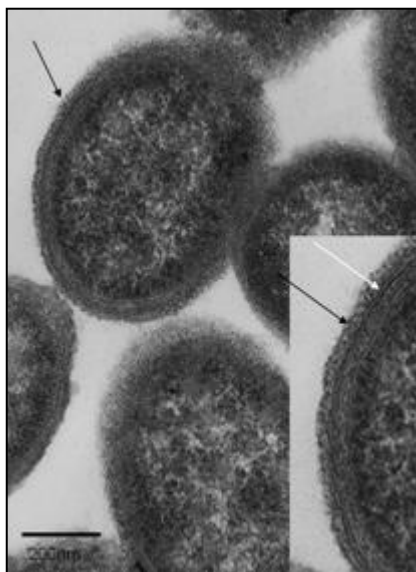


Figura 1.1: Micrografia di *B. fragilis* con in evidenza la capsula con pili e adesine (frecche). (Patrick S. et al., 2010).

Risulta un patogeno opportunisto, molto probabilmente per la presenza della capsula che lo protegge dalla fagocitosi ed è causa di processi infettivi a carico dell'appendice vermiforme, di setticemie, di infezioni del tratto urinario e di numerosi altri processi infettivi (ascessi, otiti, tonsilliti, polmoniti, vaginiti, salpingiti, endocarditi, meningiti, ecc.).

L'adesività dei ceppi forniti di pili e capsula è cinque volte maggiore di quella dei ceppi che ne sono privi. L'attivazione della risposta immunitaria dell'ospite costituisce un elemento di fondamentale importanza di difesa e di protezione nei confronti degli anaerobi. Gli anaerobi a loro volta, sono in grado di contrastare il sistema di difesa dell'ospite, bloccando alcuni meccanismi della risposta umorale e cellulare, legando ed inattivando, ad esempio le opsonine, coinvolte nella fagocitosi opsonino-mediata di batteri aerobi, o producendo l'acido succinico, un acido grasso a catena corta elaborato da *B. fragilis*, ma anche da altri anaerobi, in grado di inibire il killing dei neutrofilii (Stehle H.W. et al., 2001). *B. fragilis* è inoltre in grado di produrre la neuroaminidasi (Tanaka H. et al., 1992), un'enzima in grado di

rimuovere l'acido sialico dalla superficie di cellule dell'ospite e da importanti proteine immunoattive come le IgG e alcune componenti del complemento disturbando in questo modo funzioni importanti dell'ospite (Schauer R., 2004).

Una delle caratteristiche che ne favorisce la patogenicità è che *B. fragilis* è tra gli organismi anaerobi più aero-tolleranti, riescono, infatti, a sopportare concentrazioni atmosferiche di ossigeno per più di tre giorni. Sebbene siano organismi commensali dell'intestino umano possono occasionalmente causare diarrea. Questo batterio è, infatti, di potenziale interesse come patogeno alimentare, in quanto produce un'enterotossina dimostrata per la prima volta nel 1984 e associata a diarrea umana nel 1987. Questa specie differisce dalla maggior parte degli altri *Bacteroides* in quanto è catalasi-positiva, ma come gli altri può crescere in presenza del 20% di bile. L'enterotossina prodotta da *B. fragilis* è a singola catena di peso molecolare pari a 20000 Da e differisce dalle classiche enterotossine batteriche in quanto appartiene ad una classe di metalloproteasi leganti lo zinco, designate metzincine. L'enterotossina ha un ampio range di substrati proteici ed è soggetta ad autodigestione. Si ritiene che il danno intestinale di cui è responsabile sia dovuto, almeno in parte, alla sua azione proteolitica (Tartara C. et al., 1989). L'enterotossina in particolare è in grado di aderire all'E-caderina con conseguente riarrangiamento dell'actina citoscheletrica a livello della zonula adherens delle cellule epiteliali e di determinare perdita delle giunzioni strette (Wu S. et al., 1998). *Bacteroides fragilis* è in grado di convertire gli acidi biliari coniugati in acidi biliari liberi, irritanti.

B. fragilis costituisce circa il 10% di tutti i batteri Gram-negativi isolati nei casi di batteriemie e se non è adeguatamente trattato provoca una mortalità del 60%. Le modalità di trasmissione restano ancora poco chiare, sebbene molti ricercatori ritengano che sia solitamente diffusa attraverso il droplet. Si è visto inoltre che il batterio può essere trasmesso dalla madre al figlio quando si ha il passaggio attraverso la vagina durante il parto per cui entra a far parte della flora intestinale umana nei primi stadi di vita (Reid G., 2004).

E' inoltre il batterio anaerobio più resistente agli antibiotici e in particolare alla penicillina in virtù della produzione di beta-lattamasi e di altri fattori ancora sconosciuti. Risulta sensibile alla clindamicina, all'eritromicina, al metronidazolo, ai carbapenemi, alla tigeciclina e ad alcuni antimicrobici della classe delle cefamicine. La clindamicina però non è più raccomandata come primo farmaco contro *B. fragilis* a causa dell'elevato numero di casi

emergenti di resistenza (Brook I., 2007). Gli antrachinoni riducono il livello di *B. fragilis* (Nishioka K. et al., 1985).

1.1.1 Caratteristiche nutrizionali

I *Bacteroides* hanno richieste nutrizionali semplici che riflettono il loro ambiente. Molte delle specie possono crescere su un terreno specifico contenente un carboidrato fermentabile, emina, vitamina B₁₂, ammoniaca, anidride carbonica e solfuro (Varel V.H. and Bryant M.P., 1974). *B. fragilis* ha inoltre la capacità di utilizzare una miscela di peptidi per l'azoto, tuttavia i peptidi non sono utilizzati con la stessa efficienza dell'ammoniaca. Le fonti di zolfo sono invece tipicamente composti ridotti come solfuri, cisteina e tioglicolato. Per una crescita ottimale *B. fragilis* ha inoltre bisogno di ioni inorganici quali Na⁺, K⁺, PO₄³⁻, Ca²⁺ e Mg²⁺ (Caldwell D.R. & Arcand C., 1974).

Per quanto riguarda l'emina, *B. fragilis* presenta una proteina sulla membrana esterna di 44 kDa coinvolta nel suo assorbimento. Tale proteina è ferro reprimibile e bloccandola con un anticorpo policlonale viene inibita la crescita emina dipendente (Otto B.R. et al., 1990). L'anidride carbonica invece risulta essere necessaria per innescare la sintesi dell'ossalacetato.

1.1.2 Metabolismo energetico

I *Bacteroides* presentano un sistema complesso altamente regolamentato costituito da proteine di membrana esterne che legano e degradano i substrati polisaccaridici. Generalmente questi sistemi sono indotti dai loro substrati e repressi dal glucosio o altri zuccheri facilmente utilizzabili.

In *B. fragilis* un operone, amido o maltosio inducibile, con omologhi a susC, susD e susF e una α -amilasi risultano essere coinvolti nell'utilizzo dell'amido e del glicogeno (Smith C.J. & Bryant M.P., 1979); nel batterio sono inoltre stati identificati e purificati α -glucosidasi, β -glucosidasi, α -galattosidasi, β -galattosidasi, β -N-acetil-glucosaminidasi e α -fucosidasi (Berg J.O. et al. 1980).

In *B. fragilis* cresciuto in condizione di eccesso di carbonio/energia, il glucosio assorbito dalla cellula viene immagazzinato in granuli di glicogeno citoplasmatici che vengono rapidamente degradati quando il glucosio diviene limitante (Lindner J.G. et al., 1979). Il catabolismo del

glucosio a piruvato avviene tramite la via di Embden-Meyerhof (Caspari D. & Macy J.M., 1983). Durante la crescita con glucosio, emina e anidride carbonica, i principali prodotti della fermentazione prodotti da *B. fragilis* includono succinato, proprionato e acetato con minori quantità di lattato, malato e formiato (Caspari D. & Macy J.M., 1983).

B. fragilis contiene enzimi che possono desolfatare parzialmente le mucine intestinali. La capacità di degradare mucina è stata suggerita come un modo per i membri del microbiota intestinale di contribuire alla infiammazione cronica, compromettendo la protezione che la mucina fornisce sull'epitelio dell'ospite (Tsai H.H., 1992).

Il metabolismo dell'azoto dipende direttamente dall'ammoniaca essendo i *Bacteroides* incapaci di utilizzare amminoacidi come unica fonte di azoto. La crescita rapida dipende dalla captazione e fissazione dell'ammoniaca in glutammato. I *Bacteroides* hanno due vie per poter assimilare l'ammoniaca. La prima è la glutammina sintetasi/glutammato sintasi associato alla crescita in condizioni limitate di ammoniaca (Yamamoto I. et al., 1984). La glutammina sintetasi in *B. fragilis* presenta dimensioni maggiori (82827 Da) e nella sua forma nativa si presenta come un esamero e non come un dodecamero, inoltre non sembra essere regolato da adenilazione (Southern J.A. et al., 1986). Dato che i *Bacteroides* nel loro ambiente naturale sono raramente esposti a concentrazioni ridotte di ammoniaca, hanno sviluppato un secondo pathway di assimilazione dell'ammoniaca, che rappresenta per loro la strategia principale incorporando direttamente l'ammoniaca in glutammato via glutammato deidrogenasi, di cui esistono due isoforme in *B. fragilis* (Baggio L. and Morrison M., 1996). *Bacteroides fragilis* ha inoltre una notevole attività proteolitica, ma non può usare i peptidi come unica fonte di carbonio ed energia. *B. fragilis* è in grado di sintetizzarsi i suoi amminoacidi de novo. Il glutammato rappresenta la fonte primaria per gli α -amino gruppi di amminoacidi che si formano attraverso transaminazione dei corrispondenti 2-ossiacidi (Varel V.H. and Bryant M.P., 1974).

1.2 Polisaccaride A

I polisaccaridi zwitterionici (ZPSs) rappresentano un cambiamento delle nostre nozioni sull'induzione dell'immunità adattativa. Storicamente, infatti, si riteneva che solo gli antigeni peptidici potessero essere presentati tramite complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (MHCII) alle cellule T e attivarle, mentre gli antigeni carboidratici erano capaci di indurre la

risposta di specifiche IgM ma non la risposta delle IgG né di cellule della memoria (Gonzalez-Fernandez A. et al., 2008; Janeway C.A. et al., 1988). E' noto invece che i ZPSs vengono presentati a cellule T dal MHCII e hanno effetti immunomodulatori che derivano dalla loro caratteristica proprietà di possedere gruppi carichi sia positivamente che negativamente all'interno di unità di struttura ripetute (Tzianabos A.O. et al., 1993, 2000, 2001). Al momento il polisaccaride A (PSA) presente sulla capsula del batterio anaerobio *B. fragilis* è il ZPS meglio caratterizzato (fig. 1.2).

Gran parte del genoma del *B. fragilis* è occupato da geni essenziali per la sintesi dei polisaccaridi capsulari, raggruppati in otto operoni policistronici. Mpi (invertasi del promotore multiplo), un membro della famiglia delle DNA ricombinasi serino specifiche, agisce come un regolatore trascrizionale globale dell'espressione dei polisaccaridi attraverso l'inversione del promotore negli orientamenti ON e OFF, fatta eccezione per il polisaccaride C (PSC) la cui espressione non è regolata da un promotore ad inversione di fase. I polisaccaridi capsulari sono fondamentali per fornire funzioni critiche per la simbiosi batterio-ospite. Per la vitalità del batterio è infatti necessario che esso sintetizzi almeno un polisaccaride capsulare, ma l'espressione di un singolo polisaccaride non sembra sufficiente a permettere la colonizzazione batterica del mammifero ospite paragonabile a quella dei batteri di tipo selvatico (Liu C.H. et al., 2007).

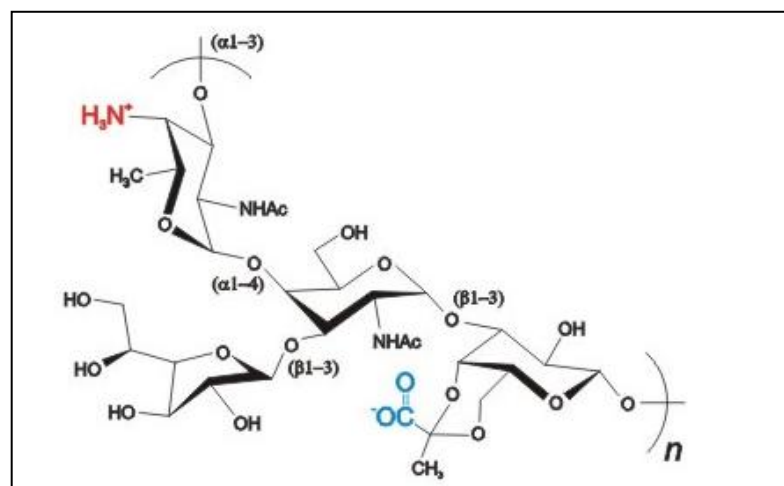


Figura 1.2: Struttura del polisaccaride A (PSA) di *B. fragilis*. (Schumann B. et al., 2014).

I loci sono regolati indipendentemente e il batterio può simultaneamente esprimere alcune combinazioni di polisaccaridi per cui ci sono 256 distinti profili di superficie. E' stato proposto

che tale variazione produce una popolazione di batteri idonei a sopravvivere nell'ambiente intestinale. E' stato dimostrato che la capacità di esprimere polisaccaridi multipli migliora la colonizzazione intestinale di *B. fragilis* (Krinos C.M. et al., 2001).

Tra i polisaccaridi capsulari di *B. fragilis* il PSA è il più potente antigene carboidratico cellula T dipendente piuttosto che cellula T indipendente ed è la molecola batterica di interesse per l'ospite durante il commensalismo più accuratamente studiata.

1.2.1 Ruolo del PSA nello sviluppo del sistema immunitario

L'ambiente sterile intestinale dei mammiferi è colonizzato dai microrganismi immediatamente dopo la nascita. Questa intrusione è necessaria per lo sviluppo del sistema immunitario dei mammiferi, ma gli esatti componenti batterici che prendono parte a questo processo di maturazione non sono ancora del tutto noti. La milza di topi germ free ha il 50% di cellule T CD4⁺ in meno rispetto alla milza di topi colonizzati convenzionalmente e queste cellule rilasciano alti livelli di IL-4, citochina tipica di cellule T helper 2 e bassi livelli di IFN γ tipica di cellule T helper 1. Questi parametri sono differenti quando i topi germ-free sono monocolonizzati con *B. fragilis* WT. Sessanta giorni dopo la monocolonizzazione di topi germ-free di 3 settimane, infatti, la conta di cellule T CD4⁺ spleniche è identica a quella dei topi colonizzati convenzionalmente. Se i topi germ-free sono monocolonizzati con *B. fragilis* Δ PSA, un mutante privo del PSA, il numero delle cellule T CD4⁺ spleniche è all'incirca simile a quello dei topi germ-free (Mazmanian S.K. et al., 2005).

Questo effetto riguarda solo le cellule T CD4⁺ in quanto il numero di cellule T CD8⁺ e di cellule B CD19⁺ non varia. I topi germ-free monocolonizzati con *B. fragilis* WT, inoltre, presentano cellule T CD4⁺ spleniche che rilasciano alti livelli di IFN γ e bassi livelli di IL-4 proprio come i topi convenzionalmente colonizzati, mentre i topi germ-free monocolonizzati con *B. fragilis* Δ PSA presentano cellule T CD4⁺ spleniche che rilasciano alti livelli di IL-4 e bassi livelli di IFN γ come i topi germ-free (Mazmanian S.K. et al., 2005).

Ciò dimostra che una singola molecola batterica come il PSA può essere essenziale per lo sviluppo del sistema immunitario ospite.

1.2.2 Presentazione dell'antigene PSA

Il polisaccaride A di *B. fragilis*, viene selettivamente impacchettato in vescicole di membrana esterna (OMVs) che una volta rilasciate all'esterno vengono internalizzate da cellule dendritiche (DCs) in maniera actina dipendente (Shen Y. et al., 2012). Nonostante il PSA sia un antigene carboidratico, viene processato come gli antigeni peptidici da cellule presentanti l'antigene (APC) attraverso il pathway endocitico e presentato dal complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (MHCII). Il pathway di processamento e presentazione però differisce da quello peptidico, in quanto la degradazione endosomale del PSA a molecola di taglia minore per la presentazione tramite MHCII, è un processo di tipo chimico dovuto alla deaminazione dell'ossido nitrico, piuttosto che un processo enzimatico (Cobb B.A. et al., 2004; Duan J. et al., 2008). Il PSA una volta processato continua a mantenere il motivo zwitterionico e la struttura glicanica di circa 15 unità ripetute (Cobb B.A. et al., 2005). Si è visto che se si rimuove la carica positiva non si altera l'endocitosi, quindi il PSA viene internalizzato al di là della carica della molecola (Cobb B.A. et al., 2008).

L'esame dei linfonodi mesenterici (MLNs) da topi germ-free nutriti con PSA marcato con una sonda fluorescente ha rivelato che il PSA è specificamente associato con le cellule dendritiche convenzionali (DCs) CD11c⁺. Il PSA marcato con la sonda fluorescente non è mai stato rilevato nella milza, indicando che le cellule dendritiche campionano gli antigeni intestinali e migrano a linfonodi locali (Mazmanian S.K. et al., 2005).

1.2.3 Immunità innata e il PSA

Tra i recettori dell'immunità innata che rilevano i microbi, i toll like receptors (TLRs) sono i meglio caratterizzati. I TLRs rispondono a una varietà di ligandi e giocano un ruolo critico per la difesa dell'ospite coordinando l'immunità innata e adattativa. Un volta legato il ligando innescano, infatti, le cellule T naive e inducono la memoria per facilitare l'eliminazione dei patogeni (Iwasaki A. & Medzhitov R., 2004).

Tra le molecole microbiche riconosciute dai TLRs vi sono i lipopolisaccaridi, la flagellina, il DNA batterico e l'RNA a doppio filamento virale (Takeda K. et al., 2003). Il riconoscimento dei commensali da parte dei TLRs è inoltre necessario per proteggere l'ospite da danni epiteliali e per l'omeostasi intestinale (Rakoff-Nahoum S. et al., 2004).

Il PSA di *B. fragilis* segnala proprio tramite TLR2 l'inizio della risposta dell'immunità innata e adattativa (Wang Q. et al., 2006). Quando il PSA, infatti, lega il TLR2 sulle APC, si ha attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, con conseguente produzione di ossido nitrico (NO), della citochina pro-infiammatoria TNF- α e di altre importanti molecole immunologiche come l'IL-12. Inoltre, il legame porta a up-regolazione del MHCII, di CD86 e del recettore della chemiochina di tipo 7 (CCR7). La segnalazione tramite TLR2 su cellule dendritiche (DC) è necessaria per la differenziazione delle cellule T_{H1} e per stabilire l'equilibrio T_{H1}/T_{H2} (Wang Q. et al. 2006).

DC umane posseggono sulla loro superficie anche uno specifico recettore per il PSA, il DC-SIGN appartenente alle lectine di tipo C. Tale recettore riconosce il gruppo laterale glicanico del PSA β -D-Galf (Bloem K. et al., 2013). Nel topo vi sono otto omologhi di DC-SIGN. Tra questi si è visto che il recettore capace di legare il PSA è SIGNR1 (Bloem K. et al., 2013).

L'attivazione di cellule T richiede la presenza di HLA-DR e molecole costimolatorie CD40 e CD86 sulla superficie delle APC (Stephen T.L. et al., 2005).

Oltre alle DC convenzionali anche le DC plasmacitoidi sono in grado di internalizzare il PSA tramite TLR2 e un numero minore di queste rispetto alle DC CD11c⁺ sono necessarie per indurre la risposta di cellule T CD4⁺ regolatorie a produrre IL-10. In particolare per l'attivazione di cellule T oltre all'MHCII è necessaria la presenza di molecole costimolatorie CD86 e ICOSL sulle PDC che vengono riconosciute rispettivamente da CD28 e ICOS presenti sulle cellule T CD4⁺ (fig. 1.3) (Dasgupta S. et al., 2014).

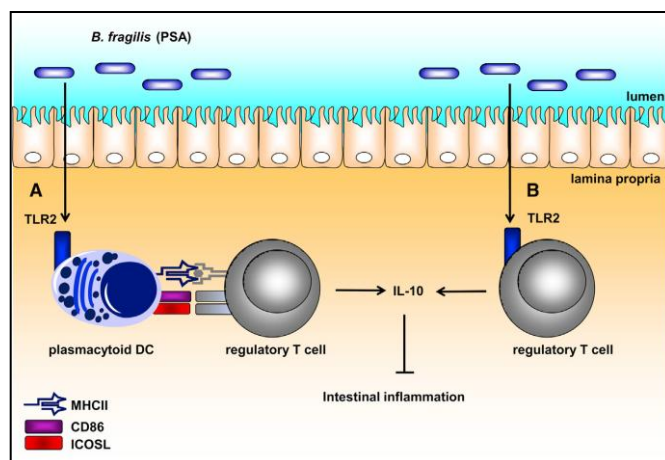


Figura 1.3: Il PSA previene l'infiammazione intestinale inducendo la produzione di IL-10 da parte di cellule T regolatorie. (Kayama H. & Takeda K., 2014).

Il PSA presentato all'interno del'MHCII delle APC lega specificamente il TCR a livello della regione ipervariabile CDR3 della catena β , questa regione presenta amminoacidi a carica positiva e negativa che legano le cariche opposte del polisaccaride in modo da neutralizzarlo (Johnson JL et al., 2014).

1.2.4 Prevenzione di malattie infiammatorie intestinali e ruolo anti-infiammatorio del PSA

Le malattie intestinali infiammatorie (IBD) sono caratterizzate dalla risposta infiammatoria di cellule T $CD4^+$ nel tratto gastrointestinale. Queste risposte sono generalmente rivolte contro batteri quali *Helicobacter*, *Clostridium* e *Enterococcus* che possono essere membri della normale microflora intestinale.

Si è visto che *B. fragilis* è in grado di prevenire la colite indotta da *H. hepaticus* tramite una serie di interazioni cellulari orchestrate proprio dal PSA. In topi germ-free monocolonizzati con *B. fragilis* WT si è osservato un aumento di cellule $CD4^+CD45Rb^{low}$ e si ritiene che siano proprio queste cellule a conferire le proprietà anti-infiammatorie che proteggono l'animale modello dalle IBD. In topi germ-free monocolonizzati con *B. fragilis* Δ PSA il numero di queste cellule non aumenta ma è simile a quello registrato in topi germ-free (Mazmanian S.K. et al., 2008).

Quando in topi $Rag^{-/-}$, ovvero topi privi di cellule T e B funzionali, infettati con *H. hepaticus*, si sono trasferite cellule $CD4^+CD45Rb^{high}$ si è generata colite nell'arco di 2 mesi. La patologia era caratterizzata da infiammazione, iperplasia al colon e espressione di citochine proinfiammatorie. Se il trasferimento avveniva in topi co-infettati con *B. fragilis* WT non si aveva sviluppo della malattia, che invece si sviluppava nei topi co-infettati con *B. fragilis* Δ PSA. Inoltre se veniva somministrato per via orale PSA purificato ai topi monocolonizzati con *H. hepaticus*, questi risultavano completamente protetti dalla colite indotta da *H. hepaticus*, infatti non si riscontrava né infiltrazione di leucociti né iperplasia al colon (Mazmanian S.K. et al. 2008).

Il PSA di *B. fragilis* sembra quindi esercitare effetti immunomodulatori differenti a seconda del contesto in cui è coinvolto. In quest'ultimo caso in cui si è somministrato PSA purificato per via orale, si è anche registrato una diminuzione di cellule T_H17 , cellule che producono la

citochina proinfiammatoria IL-17 ritrovata ad alti livelli nella mucosa infiammata e nel siero di pazienti con IBD, in quanto è un potente chemioattrattore per i neutrofili (Matsuzaki G. et al., 2007). Inoltre sono cellule che rilasciano TNF- α , IL-1 β e IL-23 in pazienti con IBD e in modelli animali sperimentali di colite; queste citochine risultano diminuite nei topi colonizzati con *B. fragilis* WT e *H. hepaticus* (Chen Z. e O'Shea J.J., 2008).

Gli effetti anti-infiammatori del PSA sono mediati dal rilascio della citochina anti-infiammatoria IL-10 da parte di cellule T CD4⁺. Ci sono molti esperimenti che provano ciò, innanzitutto cellule di linfonodi mesenterici (MLN) provenienti da topi IL-10^{-/-} monocolonizzati da *H. hepaticus*, rilasciavano citochine proinfiammatorie TNF- α e IL-17, i cui livelli erano simili a quelli registrati se le stesse cellule provenivano da topi IL-10^{-/-} colonizzati da *H. hepaticus* e *B. fragilis* WT. Inoltre il PSA non protegge i topi Rag^{-/-} dalla colite se le cellule T CD4⁺CD45Rb^{high} trasferite per indurre la colite provengono da un topo IL-10^{-/-}.

Il PSA protegge i topi in maniera IL-10 dipendente anche se la colite è indotta chimicamente tramite 2,4,6 acido trinitrobenzenesulfonico (TNBS). Le cellule T CD4⁺ della milza e dei MLN di topi trattati con TNBS producono citochine proinfiammatorie IL-23, TNF- α e IL-17. I livelli di queste citochine sono significativamente ridotti se all'animale trattato con TNBS veniva somministrato terapeuticamente PSA. Il PSA riduce infatti, l'espressione di ROR γ t, il fattore di trascrizione che dirige il pathway di differenziazione delle T_H17 e non da protezione anche in questo caso se i topi in cui è stata indotta colite con TNBS sono IL-10^{-/-} (Mazmanian S.K. et al., 2008).

In particolare è stato dimostrato che *B. fragilis*, in maniera PSA specifico, determina espansione clonale delle cellule CD4⁺CD45Rb^{low}, note per le loro proprietà anti-infiammatorie e per conferire protezione in modelli sperimentali di infiammazione (Izcue A. et al., 2006).

Ulteriori esperimenti *in vitro* suggeriscono che il PSA stimola la produzione di IL-10 tramite un pathway mediato da TLR2 che coinvolge solo le cellule T; le APC non sono richieste indipendentemente dall'espressione di TLR2 e altri noti ligandi di TLR2 (per esempio Pam2CysK e Pam3CysK) non stimolano la produzione di IL-10. Sebbene il PSA si basa sui TLR2 espressi dalle DC per la produzione da parte delle cellule T di IL-12, TNF- α e IFN- γ , sembra che il PSA stimoli la produzione di IL-10 anche in maniera APC indipendente, anche se altri studi sono necessari. Inoltre il rilevamento *in vivo* di interazione diretta tra cellule T e PSA

deve essere ancora identificato. In particolare in questo momento non è chiaro come le cellule T nella lamina propria del colon interagiscano con un antigene luminale senza l'aiuto di APC (Round J.L. et al., 2011).

Se, comunque l'integrità intestinale è violata (per esempio tramite operazione chirurgica o trauma penetrante), molte differenti specie batteriche, incluso *B. fragilis*, entrano nella cavità peritoneale e si ha peritonite. Se l'ospite perde la capacità di confinare ed eliminare questi organismi intestinali, si può avere una sepsi fatale che colpisce lo stato di benessere dell'ospite e perturba l'ecosistema complesso del microbiota. Riguardo il rischio di antropomorfizzazione del *B. fragilis*, si potrebbe sostenere che è nell'interesse dell'organismo aiutare l'ospite ad evitare gravi malattie in modo che la sua nicchia ecologica possa ritornare ad uno stato di normalità. Sebbene la formazione dell'ascesso richiede cellule Th17, la produzione di IL-10 indotta da *B. fragilis* è fondamentale per contenere le risposte delle citochine pro-infiammatorie e per contenere la malattia. La risposta sistemica dell'IL-10 durante la formazione dell'ascesso è indipendente dalle cellule T e prodotta maggiormente dai macrofagi peritoneali, con solo parziale dipendenza dal TLR2 (fig. 1.4).

Pertanto, gli aspetti patogeni e simbiotici del *B. fragilis* coinvolgono sia la stimolazione di IL-10 che l'attenuazione di IL-17 (Cohen Poradosu R. et al., 2011).

Ad oggi quindi il PSA è l'unica molecola batterica che possiede caratteristiche anti-infiammatorie necessarie e sufficienti a proteggere un mammifero da patologie infiammatorie del colon.

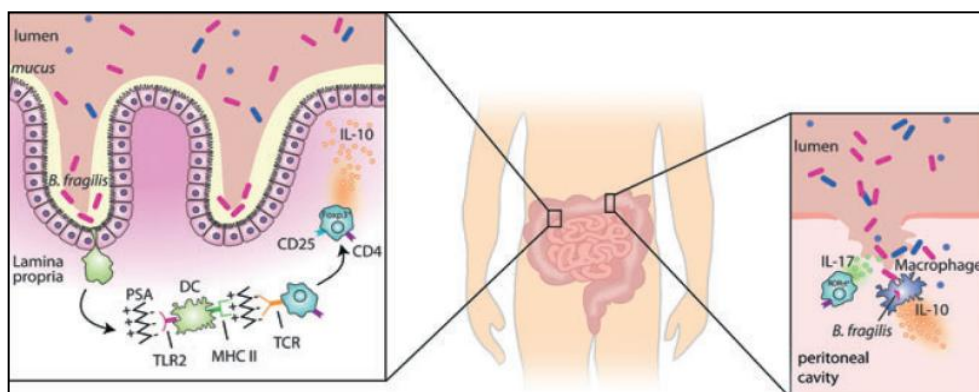


Figura 1.4: Meccanismo di prevenzione delle malattie infiammatorie intestinali indotto dal PSA (sinistra) e contenimento dell'ascesso in caso di lesione intestinale (destra). (Surana N.K. & Kasper D.L., 2012).

1.2.5 Effetti sistemici del PSA

Il PSA ha effetti profondi sulla formazione del sistema immunitario all'interno sia dei compartimenti intestinali che sistemici. E' ormai noto che la flora commensale influisce anche su sistemi lontani dall'intestino (per esempio il sistema nervoso centrale). Un numero di studi epidemiologici, con alcuni studi animali di supporto, suggeriscono che i microrganismi possono avere una relazione con lo sviluppo di malattie nervose. Man mano che si è imparato a conoscere il nesso tra gli organismi commensali e il sistema immunitario, sono stati scoperti legami di questi con le malattie sistemiche (Heijtz R.D. et al., 2011).

Gli effetti del PSA sulla risposta immunitaria extraintestinale sono stati investigati su topi modelli con encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), il modello più utilizzato nello studio della sclerosi multipla. L'utilizzo di antibiotici per eliminare il microbiota ha dimostrato il ruolo degli organismi commensali nel modulare l'esito clinico nel modello EAE. Il trattamento antibiotico era associato con l'aumento della produzione di IL-10 da parte di cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nei linfonodi cervicali e mesenterici, con conseguente protezione da malattie negli esperimenti di trasferimento adottivo (Ochoa-Reparaz J. et al., 2009). Dato questo ruolo della flora commensale nel modulare la gravità della malattia e la natura critica della produzione di IL-10 da parte di cellule Treg nel mediare la protezione dalla malattia, si è pensato che il PSA possa esercitare effetti protettivi nel modello EAE. Infatti, il pretrattamento di animali con entrambi sia *B. fragilis* WT sia PSA purificato prima dell'induzione della malattia conferiva protezione da manifestazioni cliniche.

Inoltre la somministrazione terapeutica di PSA dopo l'induzione della malattia riduce la severità dell'EAE. Come per i risultati nel modello di colite, la regolazione dell'EAE tramite il PSA coinvolge l'aumento di IL-10 prodotta da cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. In particolare, questa induzione delle cellule Treg fu osservata nei linfonodi cervicali, nonostante il PSA fosse stato somministrato oralmente (fig. 1.5).

Inoltre le cellule dendritiche CD11c^{high}CD103⁺, che sono tipicamente ristrette alla mucosa, si accumulavano nei linfonodi cervicali di topi con EAE indotta che erano esposti al PSA. Questo accumulo si è verificato solo nel contesto dell'infiammazione; topi senza l'EAE indotta a cui era stato dato PSA non mostravano alcun aumento. Questa dipendenza dallo stimolo infiammatorio non è stata ancora totalmente compresa, ma cambiamenti nella permeabilità

vascolare, nei livelli di chemochine, o l'ambiente delle citochine potrebbero essere coinvolti (Ochoa-Reparaz J. et al., 2010). Un ulteriore studio ha dimostrato che la presenza di CD39 su queste cellule T regolatorie è essenziale per la produzione di IL-10 (Wang Y. et al., 2014).

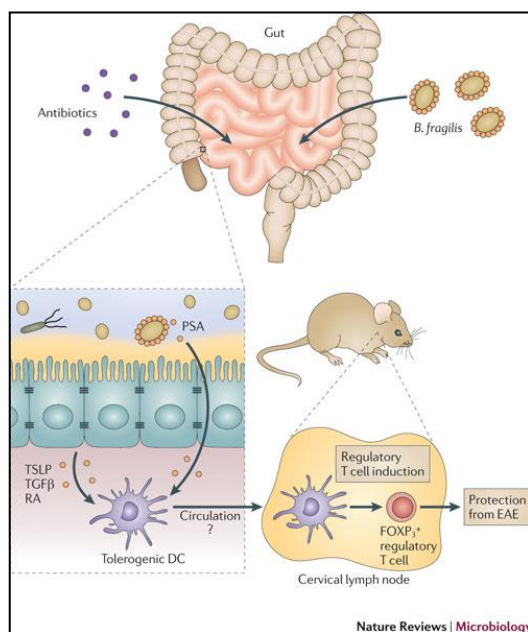


Figura 1.5: Meccanismo di protezione del PSA nei confronti dell'encefalite autoimmune sperimentale (EAE). (Willing B.P. et al., 2011).

Il PSA può quindi, sia profilatticamente che terapeutamente, ridurre i processi infiammatori in aree extraintestinali mediante un processo che coinvolge l'homing delle cellule dendritiche mucosali in siti distanti dall'infiammazione.

CAPITOLO 2

Bartonella henselae e bartonellosi

2.1 Bartonella henselae

Bartonella henselae (fig. 2.1), precedentemente nota come *Rochalimaea henselae* e riclassificato nel 1993, è la specie più nota del genere *Bartonella*. *Bartonella henselae* è un piccolo bacillo Gram-negativo, intracellulare facoltativo, leggermente ricurvo, aerobio, ossidasi negativo, non capsulato, non sporigeno e immobile, infatti al microscopio elettronico non rivela flagelli utili per facilitare il suo movimento. La dimensione media del batterio è di 2 µm di lunghezza e di 0,5-0,6 µm di larghezza. La temperatura ottimale di crescita è di 37°C, ma replica *in vitro* fra 28°C e 37°C ed è resistente al congelamento. E' molto sensibile alle variazioni di pH e vive in un range di pH compreso tra 6,8 e 7,2.



Figura 2.1: *Bartonella henseale* al TEM. (<http://www.selfhealgo.com>).

Il genoma circolare di *Bartonella henselae* è stato completamente sequenziato nel 2004 ed ha una dimensione di circa 1,9 Mb con una frazione codificante stimata del 72,3%, leggermente superiore a quella di *Bartonella quintana* con un genoma di 1,5 Mb. *Bartonella henselae* comprende molteplici ceppi geneticamente diversi. Due tipi di *Bartonella henselae*, classificate sulla base di differenze nelle sequenze dell'RNA ribosomiale 16 S, sono: Houston-1 (tipo I) e Marsiglia (tipo II) e comprendono a loro volta almeno due sottogruppi. Il gatto, serbatoio naturale della *Bartonella* può essere co-infettati da *B. henselae* con rRNA 16S di

tipo I e II anche se esistono differenze regionali nella diffusione delle infezioni. Non è ancora stato stabilito se il tipo di rRNA 16S sia il mezzo più accurato per descrivere le differenze genetiche tra gli isolati di *B. henselae*. Sono in esame molti altri metodi e la piena ampiezza della diversità genetica entro la specie *B. henselae* è ancora da definire. La variazione genetica rende difficile sviluppare un vaccino, ma è utile negli studi epidemiologici e può risultare preziosa per far aumentare la comprensione della patogenicità dei vari ceppi di *Bartonella* (Maruyama S. et al., 2001).

Insolitamente *Bartonella henselae* è incapace di utilizzare il glucosio, abbondante negli ospiti mammiferi per ricavare energia, dovuto al fatto che ha un percorso di glicolisi incompleta. *Bartonella quintana*, una specie strettamente correlata a *Bartonella henselae*, presenta un metabolismo simile, infatti, entrambi i batteri usano il catabolismo degli amminoacidi per generare energia. E' stato stabilito che *Bartonella quintana* metabolizza principalmente succinato e glutammato (Huang K.Y., 1967; Weiss E. et al, 1978), mentre *Bartonella henselae* utilizza ugualmente succinato e glutammato, ma anche istidina, asparagina, glicina e serina (Chenoweth M.R. et al, 2004).

La presenza della *Bartonella* può essere rilevata istologicamente tramite la colorazione di Warthin-Starry, mentre la localizzazione intracellulare dei batteri negli eritrociti e nelle cellule endoteliali può essere evidenziata tramite marcatura con carbossi fluoresceina succinimidil estere (CFSE) (Yuan C. et al., 2012). Questi batteri, inoltre, crescono bene in terreni di coltura arricchiti con il 5-10 % di sangue di montone o coniglio e necessitano di un'incubazione in presenza del 5% di anidride carbonica, anche se perdono spesso virulenza attraverso passaggi seriali in questi terreni, probabilmente per perdita di adesine di superficie e altri fattori ancora non identificati (Kyme P. et al., 2003).

Uno dei fattori di patogenicità meglio caratterizzati in *B. henselae* è l'adesina A di *Bartonella* (BadA), un adesina di grosse dimensioni (~240 nm di lunghezza, monomero: 328 kDa, trimero: ~1000 kDa) (Riess T. et al., 2004) che costituisce un denso strato agli elettroni su tutta la superficie batterica (Kaiser P.O. et al., 2008). BadA appartiene alla classe di adesine trimeriche autotrasportanti (TAA), che rappresentano importanti fattori di virulenza dei patogeni Gram-negativi (Linke D. et al., 2006) ed è fondamentale per l'adesione di *B. henselae* alle cellule endoteliali e ai componenti della matrice extracellulare (ECM) come il

collagene, la laminina o la fibronectina in condizioni statiche e dinamiche (Müller N.F. et al., 2011).

Tutte le TAA sono costituite da una testa, un collo, uno stelo e una porzione di ancoraggio alla membrana. A livello della testa vi è l'estremità N-terminale, mentre a livello della porzione di ancoraggio alla membrana l'estremità C-terminale conservata in tutte le TAA e contenente l'attività di autotrasporto che caratterizza tale famiglia (Meng G. et al, 2006; Wollmann P. et al., 2006). Lo stelo funge invece da distanziatore tra la superficie della cellula batterica e la testa dell'adesina in modo da portare questa il più vicino possibile alla molecola con la quale legherà (Linke D. et al., 2006). BadA presenta una struttura modulare in cui i vari domini sono responsabili delle diverse funzioni biologiche della proteina e la testa è la porzione biologicamente più attiva (Kaiser P.O. et al., 2008), mentre alcuni domini dello stelo sono essenziali per il legame ai componenti della matrice extracellulare e in particolare alla fibronectina (Kaiser P.O. et al., 2012).

2.1.1 Ciclo vitale e strategia di infezione

Il ciclo vitale di *Bartonella henselae* (fig. 2.2) inizia con l'inoculazione del batterio in un mammifero ospite che funge da serbatoio. Il principale serbatoio di *Bartonella henselae* è il gatto, nel quale l'infezione decorre abitualmente in forma pressoché asintomatica caratterizzata da batteriemie prolungate (di parecchi mesi o anni) e ricorrenti, anche in presenza di una risposta immunitaria rilevabile. Raramente nei gatti infetti, *B. henselae* può determinare, come accade nei cani e nell'uomo, miocardite piogranulomatosa e miosite diaframmatica soprattutto se questi presentano stress e cattiva alimentazione (Varanat M., 2012).

Gli artropodi ematofagi agiscono come vettori della *Bartonella*. Ad esempio, la pulce del gatto, *Ctenocephalides felis*, assume *B. henselae* nutrendosi del sangue di gatti infetti e trasmette in maniera efficiente il batterio in gatti privi di organismi patogeni; e molto probabilmente graffi superficiali sulla pelle mediano la trasmissione all'uomo. E' stato dimostrato che l'inoculazione intradermica nei gatti di feci delle pulci, contenenti *B. henselae*, provoca batteriemia (Foil L. et al., 1998). Quindi un ruolo centrale nella diffusione dell'infezione tra i gatti è svolto dalla pulce, anche se, recentemente, è stato dimostrato che zecche quali *Ixodes pacificus* ed *Ixodes ricinus* possono ospitare il microrganismo e quindi

essere potenzialmente in grado di trasmetterlo all'ospite, uomo compreso, attraverso il pasto di sangue.

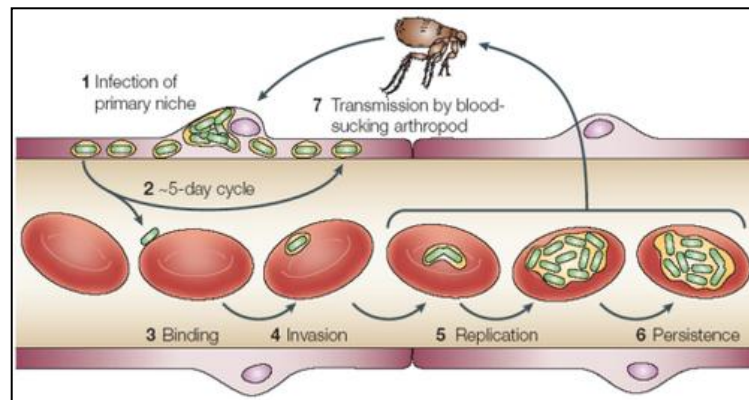


Figura 2.2: Ciclo infettivo di *B. henselae* nell'ospite umano. (Dehio C., 2005)

La trasmissione dell'infezione dal gatto all'uomo avviene solitamente attraverso il graffio o il morso ed è legata alla presenza del batterio sugli artigli e/o nel cavo orale. *Bartonella henselae* può contaminare gli artigli del gatto quando questi entrano in contatto con feci delle pulci infette presenti sulla cute (nelle quali il batterio è vitale fino a 9 giorni). *Bartonella henselae*, inoltre, può contaminare direttamente la cavità orale, sia attraverso sanguinamenti conseguenti a patologie gengivali e/o dentali, sia indirettamente quando il gatto si lecca la cute o gli artigli contaminati (Fabbi M. et al., 2005). Generalmente l'animale serbatoio non presenta sintomi di malattia, suggerendo uno specifico adattamento all'ospite con elusione della risposta immunitaria (Schulein R. et al., 2001).

Dopo l'inoculazione, *B. henselae* non è in grado di colonizzare direttamente gli eritrociti, ma è necessario un periodo di soggiorno in una nicchia primaria per rendere il batterio competente per l'invasione. Dalla nicchia primaria, *B. henselae* viene riversata nel flusso sanguigno e infetta gli eritrociti in una serie di fasi che vanno dall'adesione all'invasione, fino alla persistenza intracellulare che consente la continua trasmissione da parte del vettore. Durante tutto il corso dell'infezione, la mancanza di un'efficace risposta immunitaria dell'ospite e il profilo infiammatorio globalmente moderato sono estremamente utili per la *Bartonella* e sono promossi dal patogeno sia tramite evasione immunitaria passiva sia mediante immunomodulazione attiva (Schulein R. et al., 2001).

Non ci sono ancora dati sufficienti che dimostrino quale sia l'identità cellulare della nicchia primaria. Tuttavia, accordanti condizioni cliniche, dati *in vitro* supportanti interazioni con l'agente patogeno e la loro vicinanza alla circolazione, fanno pensare che le cellule

endoteliali, importante bersaglio *in vivo* di *B. henselae*, siano una possibile nicchia primaria (Dehio C., 2005).

Inoltre la chiara necessità del trasporto del batterio all'interno dell'ospite (per esempio, quando si ha inoculazione intradermica) implica che le cellule migratorie possano svolgere un ruolo nell'infezione da *B. henselae*. Sembra, infatti, ragionevole supporre che *B. henselae* possa infettare cellule migratorie dopo l'inoculazione e essere trasportata passivamente verso una determinata area nel corpo dell'ospite, dove vi siano le condizioni ottimali per sopravvivere e moltiplicarsi. Il frequente coinvolgimento dei linfonodi, durante le infezioni da *Bartonella*, può significare che tale trasporto possa avvenire attraverso il sistema linfatico, ed è stato proposto che linfociti o fagociti mononucleati possano essere i veicoli di trasporto di *B. henselae* fino alla nicchia primaria (Kordick D.L. et al., 1999).

La vita lunga di queste cellule e la loro capacità di migrare tra i vasi e i tessuti, non solo può essere parte del ciclo di infezione classica di *B. henselae*, ma potrebbe anche incidere sulla diffusione del patogeno nel corpo dell'ospite, come complicazione comune della malattia da graffio di gatto. Le cellule migratorie potrebbero avere quindi un ruolo nella strategia di infezione della *Bartonella*, considerando che *B. henselae* può resistere all'uccisione dei macrofagi almeno 3 giorni e stabilire una nicchia intracellulare in queste cellule distinta dalla via endocitica (Kyme P.A. et al., 2005). Coerentemente con ciò, un modello murino infettato con *B. henselae* ha rivelato la presenza di batteri nel fegato e nei linfonodi entro 6 ore dall'inoculazione intraperitoneale (Karem K.L. et al., 1999) e ciò è difficile da spiegare senza un meccanismo di trasporto del patogeno all'interno dell'ospite.

Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che *B. henselae* può invadere diversi tipi cellulari tra cui le cellule epiteliali (Batterman H.J. et al., 1995), le cellule endoteliali (Dehio C. et al., 1997), le cellule progenitrici ematopoietiche (Mandle T. et al., 2005), i monociti/macrofagi (compresi le cellule microgliali) (Kempf V.A. et al., 2005a), le cellule progenitrici endoteliali (EPC) (Salvatore P. et al., 2008) e addirittura le cellule delle zecche (Billeter S.A. et al., 2009). Tale capacità è molto probabile che contribuisca alla elevata eterogeneità della malattia, la quale si presenta con una moltitudine di sintomi differenti, che possono insorgere in pazienti umani affetti per esempio dalla malattia sistemica da graffio di gatto.

L'ingresso di *B. henselae* nelle cellule endoteliali umane può avvenire in due modi: sia come batteri singoli utilizzando un meccanismo zipper-like (Kempf V.A. et al., 2000), sia come

grandi aggregati in una struttura peculiare nota come invasoma (Dehio C. et al., 1997). L'acquisizione di singoli batteri o piccoli agglomerati tramite meccanismo zipper-like (fig. 2.3) da origine a vacuoli contenenti *B. henselae* (BCV) che non si acidificano nè si fondono con i lisosomi, ma si accumulano nello spazio perinucleare (Kyme P.A. et al., 2005).

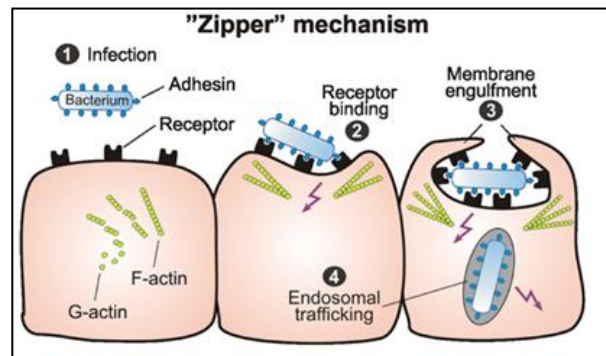


Figura 2.3: Meccanismo di infezione "zipper like". (O' Croinin T. et al., 2012).

L'ingresso di *Bartonella* nelle cellule endoteliali risulta essere interamente o in parte dipendente dall'attivazione di Rho, Rac e Cdc42, piccole GTPasi che controllano l'organizzazione dell'actina e il riarrangiamento del citoscheletro. Infatti l'interazione del batterio con l'endotelio vascolare, porta all'attivazione di una GTPasi, che stimola la polimerizzazione dell'actina e porta all'internalizzazione del microrganismo. Il processo di invasione è quindi actina-dipendente e avviene nell'arco di poche ore.

L'altro meccanismo è l'assorbimento mediato dall'invasoma (fig. 2.4). Questo meccanismo di invasione cellulare dai batteri è stato studiato utilizzando come modello *in vitro* per la colonizzazione endoteliale, cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) infettate da *B. henselae*. Inizialmente, le cellule endoteliali stabiliscono contatto cellulare con i batteri e mediano l'aggregazione batterica sulla superficie cellulare.

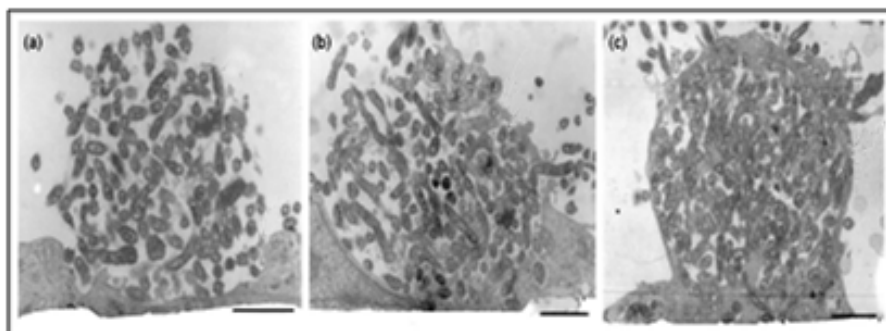


Figura 2.4: Micrografie degli stadi di formazione dell'invasoma. (Dehio C. et al., 1997).

Successivamente, l'aggregato batterico formato è interiorizzato nella cellula ospite da una struttura cellulare unica, chiamata invasoma. La formazione di un invasoma di solito richiede 24 ore. La F-actina corticale, la molecola di adesione intercellulare-1 e la fosfotirosina sono abbondanti nelle protrusioni di membrana delle cellule endoteliali e permettono l'intrappolamento dell'aggregato batterico. La formazione dell'invasoma è inibita da citocalasina D, un metabolita fungino, che si lega all'estremità positiva dei filamenti di actina bloccando la loro polimerizzazione o frammentandoli qualora la concentrazione di citocalasina D sia elevata. Il meccanismo non è invece influenzato da nocodazolo, colchicina o taxolo, che interferiscono con la polimerizzazione dei microtubuli, indicando che l'invasione mediata dall'invasoma è un processo actina-dipendente e microtubuli-indipendente. L'internalizzazione batterica tramite invasoma è stata costantemente osservata in diversi isolati clinici di *B. henselae* (Dehio C. et al., 1997).

B. henselae è abile nel colonizzare tessuti vascolari, indurre vaso proliferazione e attivare processi infiammatori. Studi *in vitro* indicano che *B. henselae* ha attività mitogena in coltura e sia *in vivo* che *in vitro* si è dimostrato che l'attività angiogenica può derivare dalla secrezione del fattore inducente l'ipossia (HIF-1) da parte del batterio (Pugh C.W. & Ratcliffe P.J., 2003), un fattore di trascrizione che comporta successivamente la secrezione di citochine con effetto vaso proliferativo come il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) (Kempf V.A. et al., 2005b). L'attivazione di HIF-1 in *B. henselae*, si è visto essere correlata all'aumento di espressione di BadA (Riess T. et al., 2004) (fig. 2.5).

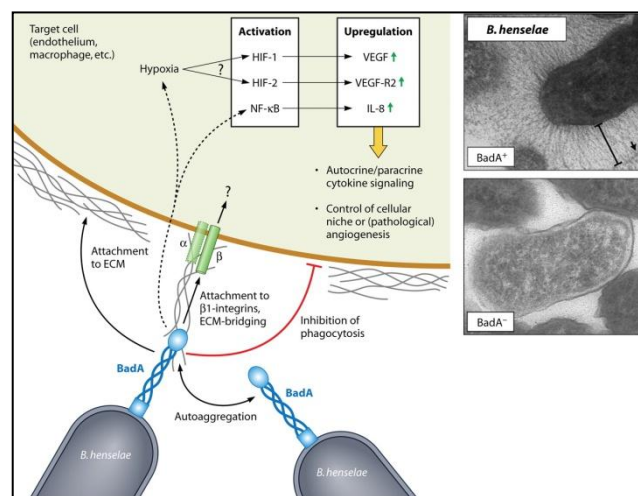


Figura 2.5: Probabile meccanismo di attivazione di HIF-1 e conseguente stimolazione angiogenica indotta da *B. henselae*. (Harms A. & Dehio C., 2012).

Le lesioni vasoproliferative provocate da *B. henselae* sono tipicamente infiltrate da neutrofili. In genere la reazione infiammatoria implica l'attivazione endoteliale. Chemochine, interleuchina 1 (IL-1) e fattore di necrosi tumorale (TNF) aumentano l'espressione delle molecole di adesione sull'endotelio in particolare della P-selectina, che permette il "rolling" dei neutrofili. Le chemochine presenti sulla superficie endoteliale, i leucotrieni e il TNF inducono l'espressione delle integrine leucocitarie, come le molecole di adesione ICAM-1 (Dehio C. et al., 2001).

Nel corso dell'infezione, dopo la colonizzazione della nicchia primaria, i batteri si riversano nel flusso sanguigno, dove infettano gli eritrociti, stabilendo una nicchia protetta competente per la trasmissione del vettore e per procedere quindi nel ciclo d'infezione (Chomel B.B. et al., 2009). L'invasione degli eritrociti prevede diverse fasi: adesione, deformazione, invasione e persistenza intraeritrocitaria. Studi hanno mostrato che le proteine eritrocitarie legate da *B. bacilliformis* e *B. henselae* sono simili e includono principalmente actina e spectrina (Iwaki-Egawa S. et al., 1997), più precisamente *B. bacilliformis* interagisce con le subunità α e β della spectrina, con la proteina della banda 3, con la glicoforina A e con la glicoforina B (Buckles E.L. et al., 2000). Gli eritrociti sviluppano progressive rientranze e invaginazioni nei siti in cui legano *B. bacilliformis* (Benson L.A. et al., 1986), un processo noto come deformazione, confermato anche per *B. henselae* (Iwaki-Egawa S. et al., 1997). Il meccanismo molecolare alla base della deformazione non è ancora chiaro così come quello dell'invasione degli eritrociti, ma l'interazione con la proteina della banda 3, con la spectrina e con la glicoforina sono evidenti, visto che queste proteine servono anche come recettori per il *Plasmodium falciparum*, l'agente eziologico della malaria (Facer C.A., 1983).

Non è ancora totalmente chiaro nemmeno come procede l'infezione negli eritrociti dopo l'invasione, ad esempio, in che modo i batteri accedono ai nutrienti all'interno del globulo rosso. L'analisi di eritrociti di ratto infettati *in vivo* da *Bartonella tribocorum*, ha evidenziato che i batteri restano all'interno di un compartimento membranoso (Schulein R. et al., 2001). Esperimenti su modello murino hanno inoltre evidenziato, che i globuli rossi sono inizialmente infettati da non più di uno o due batteri, che si dividono per due o tre volte, dando luogo a otto batteri, in media, per eritrocita e persistono per l'arco di vita residua dell'eritrocita, che non è apparentemente accorciata dall'infezione (Schulein R. et al., 2001).

I titoli anticorpali batterici nel sangue possono raggiungere 10^6 o addirittura 10^7 (Kosoy M. et al., 2004), ma in genere sono inferiori di due o più ordini di grandezza (Bai Y. et al., 2008), una variazione dipendente forse sia dalle diverse specie di *Bartonella* che dall'ospite, dalle caratteristiche immunologiche e dalla fase di infezione. La durata della batteriemia da *Bartonella* non è nota (Breitschwerdt E.B. et al., 2000) ed è difficile da determinare a causa delle recidive dalla nicchia primaria e delle reinfezioni dovute all'alta incidenza di batteriemia da *Bartonella* fra le principali comunità di mammiferi selvatici (Kabeya H. et al., 2002).

2.1.2 Evasione della risposta immunitaria e immunomodulazione

Bartonella henselae durante l'infezione evita la risposta immunitaria dell'ospite sia mediante "camuffamento" passivo che tramite inganno (deception) attivo (Merrell D.S. et al., 2004). Tramite questa doppia strategia mira alla colonizzazione della nicchia intraeritrocitaria, dove il batterio è protetto sia dall'immunità innata che adattativa e persistono in un compartimento competente per la trasmissione da parte del vettore. In pratica si ha un mascheramento o un cambiamento dei profili molecolari associati al patogeno (PAMP), per esempio dei lipopolisaccaridi (LPS), che permettono alla *Bartonella* di impedire il suo riconoscimento come agente batterico patogeno. Inoltre, *B. henselae* è in grado di manipolare il sistema immunitario dell'ospite su scala sistemica per raggiungere uno stato di attenuazione immunologica.

La stimolazione della secrezione dell'interleuchina 10 (IL-10), una citochina anti-infiammatoria, è importante nella modulazione immunitaria da parte della *Bartonella*. Questa citochina è un regolatore chiave dell'immunità avendo un effetto moderatore sulla risposta immunitaria, che va dalla soppressione delle funzioni di diverse cellule immunitarie, come le cellule T helper, i monociti/macrofagi e le cellule dendritiche, all'interferenza sia con l'immunità innata che con la risposta da parte del sistema immunitario adattativo. Nonostante il basso livello di infiammazione risultante dall'infezione può contrastare la patologia acuta nell'ospite, è evidente che gli effetti della secrezione di IL-10 favoriscono notevolmente un asintomatico e persistente corso di infezione, che costituisce un vantaggio per la *Bartonella*.

Il livello di IL-10, durante le infezioni, attenua le conseguenze dell'infezione sia per l'ospite, ad esempio prevenendo danni ai tessuti, sia per il patogeno, con l'attenuazione del sistema immunitario e, infatti, la stimolazione della produzione di IL-10 è una caratteristica comune di molti patogeni intracellulari, che stabiliscono infezioni persistenti (Cyktor J.C. et al. 2011). Il ruolo centrale dell'IL-10 per la *Bartonella* è stato dimostrato mediante modello murino infettato da *B. birtlesii*, dove il patogeno non era in grado di stabilire batteriemia nel topo knockout per IL-10 (Marignac G. et al., 2010). Anche gli esseri umani infettati da *B. quintana* mostravano elevati livelli di IL-10 ed esibivano un "profilo infiammatorio attenuato" (Capo C. et al., 2003). *B. henselae*, ugualmente, promuove la secrezione di IL-10 nei topi, nei gatti e negli esseri umani sia *in vitro* che *in vivo* (Kabeya H. et al., 2007).

In uno studio su topi infettati da *B. birtlesii* si è ulteriormente scoperto che, nei topi knockout per CD4, cioè privo di cellule T helper, la batteriemia è più lunga ed è caratterizzata da un titolo anticorpale batterico superiore rispetto all'infezioni in topi wild-type (Marignac G. et al., 2010). Ciò può derivare dal ruolo chiave svolto dall'immunità umorale e dai fagociti professionali nell'infezione da *Bartonella*, entrambi i quali richiedono le cellule T helper.

Al contrario, infettando topi knockout per CD8 non c'erano differenze rispetto agli animali wild-type. Questi risultati sono paragonabili a quelli di un altro studio in cui è stato usato, come serbatoio di infezione, un topo modello infettato con *B. grahamii* (Koesling J. et al., 2001). In questo studio, la mancanza di cellule B e la mancanza di cellule B e T prolungava notevolmente la batteriemia da *Bartonella*. Condizione simile a quanto osservato nel modello di ratto infettato da *B. tribocorum* dove i topi privi di cellule B non sono in grado di produrre anticorpi contro *Bartonella*, i quali potrebbero eliminare i batteri dalla nicchia primaria, (Schulein R. et al., 2001). Il trasferimento di siero immune da topi wild-type infetti da *Bartonella grahamii* a topi deficienti di cellule B, è sufficiente a ripristinare la batteriemia registrata nei topi wild-type (Koesling J. et al., 2001.).

La risposta delle cellule T helper 2 (TH2) e la conseguente attivazione dell'immunità umorale tramite IL-4 è stata osservata nei gatti naturalmente infettati da *B. henselae* (Kabeya H. et al., 2006). La produzione di anticorpi specifici gioca un ruolo fondamentale per la rimozione della *Bartonella* dal sangue, ma non è sufficiente per eliminare i batteri intracellulari dalla nicchia primaria, in quanto si osserva batteriemia recidiva. Questa conclusione è confermata da un altro studio che mostra che gli anticorpi anti-*B. henselae* possono prevenire la

patologia in gatti infetti, ma non riescono a proteggerli dalla batteriemia (O'Reilly K.L. et al., 2001). Si è inoltre accertato il ruolo centrale delle cellule T helper 1, che secernendo interferone gamma (IFN- γ) e il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α), stimolano l'immunità cellulare al fine di eradicare *B. henselae* da gatti infettati sperimentalmente (Kabeya H. et al., 2009).

L'effetto dell'infezione da *Bartonella* sul numero dei linfociti differisce tra le varie specie del patogeno, dato che i gatti infettati da *B. henselae* mostrano una riduzione transitoria del numero di cellule T CD4⁺ (Kabeya H. et al., 2009), ma il motivo o l'importanza di questi risultati contrastanti è poco chiaro. In definitiva, la presenza sia dell'immunità cellulare che umorale sembra essere necessaria per l'eradicazione completa di *Bartonella* dall'ospite serbatoio e l'agente patogeno contrasta attivamente tale risposta immunitaria.

Diversi studi che hanno valutato le infezioni in topi da *B. henselae* riferiscono che i batteri non sono riusciti a causare batteriemia perchè inducono la risposta di cellule T helper 1 che secernono IFN- γ eliminando il patogeno (Arvand M. et al., 2001). L'IFN- γ , infatti, svolge un ruolo principale nell'attivare fagociti e l'immunità T-helper mediata in risposta all'infezioni da *Bartonella* (Karem K.L. et al., 2000). Questi risultati sono supportati da studi *in vitro* secondo i quali l'attivazione di macrofagi murini da parte dell'IFN- γ impedisce la persistenza di *B. henselae* e induce l'uccisione dei batteri intracellulari, principalmente tramite produzione di ossido nitrico, che ha attività microbica (Musso T. et al., 2001). L-arginina, il precursore dell'ossido nitrico, durante l'infezione da parte di *B. henselae*, determina l'aumento del metabolismo proteico, potenzia la microcircolazione, ha effetti diretti sulla risposta immunitaria ed effetti antibatterici. Infettando le EPC umane con *B. henselae*, in presenza ed in assenza di L-arginina, è stato rilevato che il numero e la vitalità delle EPC risulta migliorato in presenza di L-arginina (Salvatore P. et al., 2008).

Negli esseri umani, le infezioni da *B. henselae* di solito portano alla malattia da graffio di gatto che presenta da bassa a moderata morbilità e tipicamente è autolimitante. Il caratteristico gonfiore dei linfonodi deriva dalla formazione di granulomi ricchi di cellule B che, apparentemente, caratterizzano il continuo reclutamento e la stimolazione dei macrofagi (Schweyer S., 2002). Una simile linfadenopatia è stata osservata in un modello murino di malattia da graffio di gatto, anche se nessuna formazione di granulomi era evidente e il gonfiore era in gran parte causato dalla immigrazione e proliferazione di cellule

B (Kunz S. et al., 2008). È interessante notare che l'uso di *B. grahamii* invece di *B. henselae* nello stesso studio non ha determinato linfadenopatia paragonabile, a meno che i batteri non fossero sonicati prima dell'inoculazione, mentre la linfadenopatia è evidente, con entrambe le specie di *Bartonella*, infettando topi deficienti del recettore per IFN- α/β . Questi risultati suggeriscono che *Bartonella* può attivamente indurre la secrezione di IFN- α/β per contrastare le risposte immunitarie locali attraverso meccanismi che presentano una specificità di ospite.

L'immunomodulazione data da *B. henselae* può essere indebolita in ospiti accidentali consentendo all'immunità cellulare di eliminare l'infezione, soprattutto per l'impossibilità da parte del batterio di invadere gli eritrociti, suo più importante riparo. Il corso dell'infezione in generale dipende dalla capacità dell'ospite di attivare una risposta immunitaria efficace contro *Bartonella*: mentre nella maggior parte dei pazienti non si hanno segni di malattia grave, la malattia da graffio di gatto e le altre bartonellosi possono originare devastanti infezioni sistemiche, in particolare in individui immunocompromessi, come quelli affetti da AIDS, ma anche negli animali immunodeficienti. È stato pertanto proposto che una compromissione dell'immunità cellulare può consentire alla *Bartonella* di colonizzare vari siti del corpo del mammifero (Karem K.L. et al., 2000). Le infezioni nell'ospite serbatoio da parte delle varie specie di *Bartonella* creano immunità mediata da anticorpi protettiva, che impedisce la reinfezione una volta che i batteri sono stati eliminati (Greene C.E. et al., 1996), ma che a quanto pare non conferisce protezione crociata contro *Bartonellae* distinte (Yamamoto K. et al., 1998).

2.2 Bartonellosi

Le bartonellosi sono un gruppo di malattie infettive causate da batteri del genere *Bartonella*. Quelle di cui *B. henselae* è ritenuta essere l'agente eziologico sono la malattia da graffio di gatto e due patologie tipiche di soggetti immunocompromessi ovvero l'angiomasiosi bacillare e la peliosi epatica.

2.2.1 Malattia da graffio di gatto

La malattia da graffio di gatto (Cat Scratch Disease - CSD) è una zoonosi emergente ed ubiquitaria, è stata descritta da Robert Debré nel 1950 e solo nel 1983 è stata dimostrata la

presenza di un germe nella sede delle lesioni. Diversi agenti quali virus, *Rickettsie*, *Clamidio* sono stati sospettati essere responsabili della CSD. Solo nel corso degli anni '90 si è pervenuti all'identificazione di *Afipia felis* e *Rochalimaea henselae*, poi rinominato *Bartonella henselae*, quali agenti responsabili dell'infezione. A *Bartonella henselae* vengono oggi attribuiti la maggior parte dei casi di CSD (circa il 95% dei casi di CSD nell'uomo) mentre *Afipia felis*, il primo agente inizialmente correlato alla malattia, sembra svolgere un ruolo molto marginale nell'eziologia dell'infezione.

La malattia da graffio di gatto viene considerata la causa più comune di adenopatia cronica, benigna, in bambini e giovani adulti. Da 3 a 10 giorni dopo il contatto con l'animale, nel punto di inoculazione compare una lesione cutanea pustolosa, papulosa o vescicolosa, che può persistere per giorni o settimane, guarendo senza lasciare cicatrici (fig. 2.6).

Il segno clinico dominante è l'adenopatia di un singolo linfonodo o regionale, che compare di solito entro 2 settimane dal graffio. Più dell'80% dei linfonodi interessati sono localizzati al capo, al collo ed agli arti inferiori; hanno un diametro di 1-5 centimetri ed appaiono arrossati e dolenti. Sebbene il 10-20% di essi progredisca verso la suppurazione, la maggior parte regredisce entro 2-6 mesi.

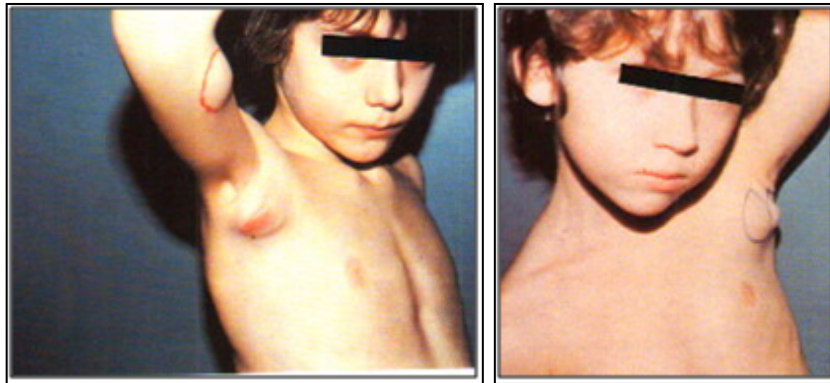


Figura 2.6: Adenopatia in giovani pazienti graffiati agli arti superiori. (<http://www.antropozoonosi.it>).

Febbricola, malessere, cefalea, anoressia, mal di gola ed artralgie possono far confondere tale malattia con la mononucleosi infettiva. L'11-12% dei casi sono caratterizzati dalla sindrome oculoglandulare di Parinaud, che consiste in una congiuntivite granulomatosa autolimitantesi associata ad una linfadenopatia ipsilaterale, per lo più preauricolare. Talora il decorso è grave con encefalopatia in circa l'1-7% dei casi, anomalie ematologiche, artrite ed eritema nodoso, mielite trasversa, paralisi del VII, neuroretinite, coinvolgimento di milza,

polmoni, fegato e cute e in un caso è riportato la presenza contemporanea di vasculite cutanea e sindrome nefrosica (Cozzani E. et al., 2011).

La più frequente manifestazione oculare, ove si eccettui la congiuntivite che non riveste caratteristiche di specificità, è rappresentata da una neuroretinite, con formazione di una stella maculare, generalmente unilaterale (fig. 2.7). Se la neuroretinite è bilaterale, si manifesta in maniera piuttosto asimmetrica. Di rado il coinvolgimento del polo posteriore può essere caratterizzato dalla presenza di una retinite focale della retina o di una papillite isolata, mentre a volte sono presenti occlusioni vascolari con emorragie intraretiniche ed essudati a fiocco di cotone.

La diagnosi è principalmente clinica e si fonda sulla presenza dell'adenopatia e della lesione primaria da inoculo sugli arti, sul collo o sul capo, in concomitanza con un contatto recente con gatti. La diagnosi di laboratorio si basa essenzialmente sull'esame diretto del materiale biotico linfonodale (con il metodo dell'impregnazione argentica di Warthin-Starry), sull'emocoltura, sui test sierologici, come EIA (enzyme immunoassay) e IFA (immunofluorescence assay) e sui metodi molecolari, come la PCR. La diagnosi differenziale si pone con infezioni micobatteriche tipiche o atipiche, tularemia, brucellosi, sifilide, linfogranuloma venereo, sporotricosi, istoplasmosi, toxoplasmosi, adenite neoplastica, cisti bronchiali.

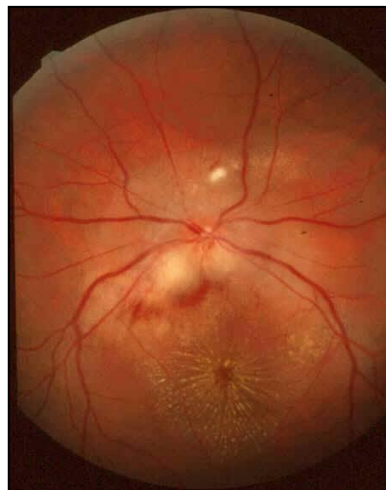


Figura 2.7: Neuroretinite con formazione di una stella maculare. (<http://www.antropozoonosi.it>).

La terapia è principalmente sintomatica poiché la malattia, di solito, regredisce spontaneamente entro 2-6 mesi. Non ci sono dati chiari circa l'utilità degli antibiotici. I risultati clinici migliori sono stati ottenuti con rifampicina, ciprofloxacina, gentamicina,

trimetoprim e sulfametoxazolo (TMP/SMX), claritromicina ed azitromicina. In uno studio retrospettivo di dati non controllati, la percentuale di pazienti, che hanno risposto completamente o parzialmente a 7-14 giorni di terapia, è stata dell'87% con rifampicina, 84% con ciprofloxacina, 73% con gentamicina solfato parenterale e 58% con TMP/SMX.

Il gatto di solito non manifesta alcun sintomo di malattia ed appare come tipico reservoir dell'infezione potendo albergare *Bartonella henselae* per parecchi mesi o anni nel torrente circolatorio in completa assenza di sintomi clinici; sono stati tuttavia descritti quadri di linfadenite in soggetti batteriemici. Il germe risulta localizzato soprattutto nel torrente circolatorio associato ai globuli rossi e talora all'interno dei macrofagi ed evoca nell'animale una risposta immunitaria rilevabile ma che risulta poco efficace ad eliminare il microrganismo.

I gatti di strada sono stati tra i più studiati e sembrano i più colpiti dall'infezione. Un ruolo centrale nella diffusione dell'infezione all'interno della popolazione felina è svolto dalla pulce del gatto (*Ctenocephalides felis*), ad essa, infatti, viene attribuita la maggior responsabilità delle elevate prevalenze di gatti batteriemici in ragione del fatto che il parassita è in grado, attraverso l'assunzione del pasto di sangue, di trasmettere l'infezione agli altri gatti oltre alla possibilità di mantenere, se non addirittura replicare il germe al suo interno.

La maggior parte dei pazienti (oltre il 90%) ricorda nell'anamnesi un graffio, un morso, una leccata da parte di un gatto sano, di solito giovane (spesso un gattino). Sono stati riportati, prima dell'insorgenza della sindrome, graffi o morsi di cani, morsi di scimmie oppure contatti con conigli, galline o cavalli, ma non in tutti i casi era stata esclusa la possibilità di una concomitante esposizione a gatti. Ci sono dunque correlazioni epidemiologiche strette fra l'essere affetto da CSD e il possedere un gatto sieropositivo alla *Bartonella* o batteriemico. Le pulci del gatto trasmettono la *B. henselae* ai gatti ma al momento non è stato dimostrato un loro ruolo diretto nella trasmissione della *B. henselae* all'uomo (Fabbi M. et al., 2000).

2.2.2 Angiomatosi bacillare

L'angiomatosi bacillare è una patologia causata non solo dall'infezione da *Bartonella henselae* ma anche da *Bartonella quintana* e si manifesta in pazienti immunocompromessi, particolarmente negli HIV-sieropositivi dove è stata riscontrata nei primi anni '80, con lesioni

nodulari cutanee ad andamento subacuto o cronico e talvolta anche con interessamento di organi profondi (encefalo, fegato, ossa). Tale patologia è stata osservata in seguito anche nei pazienti normoergici e le modalità di trasmissione sono analoghe a quelle viste per la malattia da graffio di gatto.

La patologia esordisce con la comparsa di una o più papule eritematose che tendono ad allargarsi, sino a raggiungere diversi centimetri di diametro e ad assumere un aspetto rotondeggiante. Alternativamente può presentarsi con la comparsa di lesioni nodulari sottocutanee di colore carneo, fisse o mobili sui piani sottostanti (Sood F.H. et al., 1997).

Istologicamente, lesioni cutanee si caratterizzano per la presenza di una circoscritta proliferazione capillare con strutture vascolari ectasiche, contenenti nel loro interno cellule epiteliali e istiociti. È inoltre frequente un infiltrato di granulociti neutrofili; nell'interstizio si osserva materiale basofilo granulare (contenente i bacilli gram-negativi, identificabili con la colorazione di Warthin-Starry o con l'impregnazione argentea di Steiner). A livello epatico sono talora rilevabili lesioni cistiche ripiene di sangue e circondate da uno stroma fibromixoido. Qualora vi sia interessamento epatico, i pazienti presentano febbre, epatomegalia, calo ponderale, dolori addominali e valori elevati della fosfatasi alcalina sierica e della γ -glutamilttransferasi. Clinicamente l'angiomatosi bacillare va differenziata soprattutto dal sarcoma di Kaposi, infatti, nell'angiomatosi bacillare le lesioni sono rotondeggianti e rossastre mentre nel sarcoma di Kaposi sono più piatte e di colore porpora o nero-porpora.

Solo dopo biopsia cutanea, che mette in evidenza le tipiche alterazioni e la dimostrazione dei bacilli mediante la colorazione di Warthin Starry o la microscopia elettronica è possibile effettuare la diagnosi. Nei pazienti con batteriemia, *B. henselae* può essere isolata dal sangue utilizzando le metodiche di lisi-centrifugazione.

Per la terapia si utilizza la gentamicina associata all'eritromicina, oppure alla doxiciclina. Altri farmaci attivi sono la ciprofloxacina, l'azitromicina e la rifampicina. Nei pazienti con infezioni da HIV la somministrazione di eritromicina va proseguita per 8 settimane (Moroni M. et al., 2008).

2.2.3 Peliosi epatica

La peliosi epatica è una patologia non comune caratterizzata da molteplici dilatazioni cistiche, a contenuto ematico, nell'ambito del parenchima epatico. Originariamente è stata descritta al tavolo autoptico in soggetti con stato cachettico per malattie infettive croniche, o terapie immunosoppressive. Recentemente diversi casi sono stati descritti in soggetti con infezione da HIV in fase avanzata. In questi soggetti può presentarsi isolata o associata a peliosi splenica e angiomatosi bacillare.

Il quadro clinico si caratterizza per la presenza di febbre, dolori addominali, sintomi gastrointestinali (nausea, vomito, diarrea) protratti per diverse settimane, inoltre progressiva perdita di peso fino alla cachessia, si riscontra epatomegalia. I dati ematobiochimici mettono in evidenza aumento delle transaminasi da lieve a moderato (in media 2 volte la norma), alterazione delle fosfatasi alcaline e delle γ -GT da moderata a severa (in media 5-6 volte la norma), lieve rialzo della bilirubina. Frequente è la presenza di anemia, leucopenia e piastrinopenia.

L'ecografia addominale rileva epatomegalia, disomogeneità del parenchima, noduli iperecogeni. Alla TAC si osservano lesioni ipodense. Possono coesistere segni di ipertensione portale che complicano la peliosi epatica.

Istologicamente la peliosi epatica è una variante dell'angiomatosi bacillare, caratterizzata da dilatazioni lacunari a contenuto ematico, presenza di cellule infiammatorie e focolai di necrosi di 1-2 cm di diametro sparsi su tutto il parenchima. Reperti istologici con la colorazione ematossilina-eosina mettono in evidenza spazi lacunari, sinusoidi dilatati, trombi parzialmente organizzati all'interno delle dilatazioni cistiche, stroma fibromixomatoso con cellule infiammatorie, capillari dilatati e accumuli di materiale granulare purpurico che separano gli spazi peliotici dal parenchima epatico circostante (fig. 2.8A). Analoghe lesioni sono evidenziabili a livello splenico (fig. 2.8B) (Maguina C. & Gotuzzo E., 2000).

Con la colorazione di Warthin-Starry si mettono in evidenza ammassi di batteri allungati, ramificati ad angolo retto o disposti in brevi catenelle. Questi bacilli corrispondono al materiale granulare purpurico visibile all'ematossilina-eosina. Identici bacilli sono visibili nelle lesioni cutanee dell'angiomatosi bacillare. La microscopia elettronica conferma la natura bacillare dei bastoncini evidenziati alla Warthin-Starry.

L'isolamento delle bartonelle, la dimostrazione di sequenze genetiche specifiche mediante PCR o di antigeni mediante tecniche immunoistochimiche nei materiali patologici sono modalità più sofisticate di diagnosi non disponibili nella maggior parte dei laboratori.

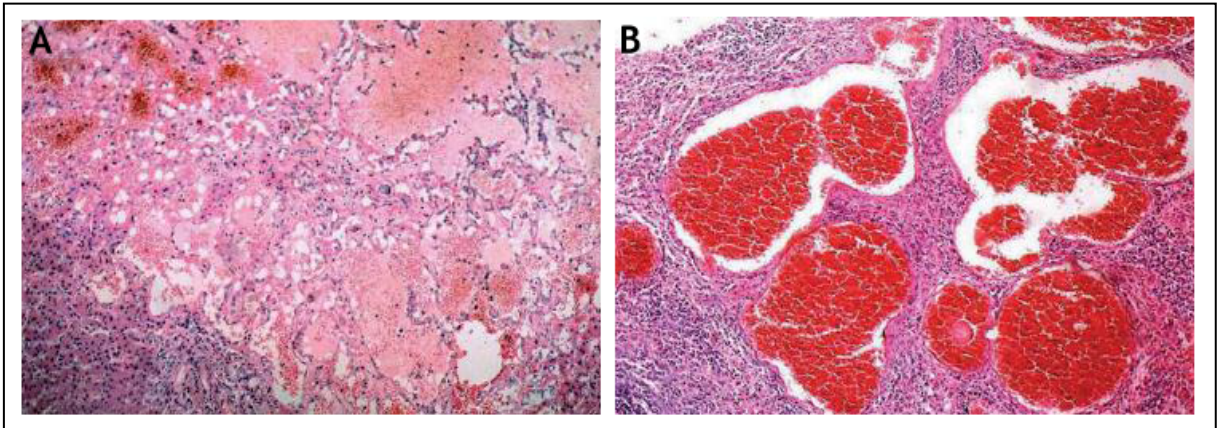


Figura 2.8: (A) Fegato affetto da peliosi epatica, con grosse dilatazioni dei sinusoidi epatici con cavità piene di sangue che sostituiscono il parenchima epatico; (B) identiche aree dilatate piene di sangue riscontrate anche nella milza. (Perez R.P. et al., 2012).

CAPITOLO 3

Scopo della ricerca e modelli sperimentali

3.1 Scopo della ricerca

E' ormai noto che il polisaccaride A (PSA) prodotto e secreto dal simbionte intestinale umano *Bacteroides fragilis*, abbia ruolo protettivo nei confronti di stati infiammatori cronici caratteristici di malattie infiammatorie intestinali (IBD).

Il PSA, infatti, stimola il rilascio della potente citochina anti-infiammatoria IL-10 da parte di cellule T CD4⁺, così come evidenziato in modelli murini di colite indotta sia da *Helicobacter hepaticus*, sia chimicamente tramite 2,4,6 acido trinitrobenzenesulfonico (TNBS) (Mazmanian S.K. et al., 2008).

Lo scopo del mio progetto di ricerca è stato quello di valutare se il PSA potesse avere un ulteriore ruolo protettivo anche di tipo sistemico nei confronti di stati infiammatori cronici extraintestinali, in particolare prendendo in esame quello conseguente all'infezione con il patogeno *Bartonella henselae*.

Nella prima parte del mio progetto ho condotto studi *in vivo* su organismi modello murini sia immunocompetenti che immunocompromessi. In particolare ho effettuato indagini morfologiche, ultrastrutturali e molecolari principalmente su fegato e aorta, organi che presentano alterazioni nelle bartonellosi.

Si sono scelti questi due modelli murini visto che *B. henselae* nell'uomo immunocompetente è responsabile della malattia da graffio di gatto, patologia che regredisce in pochi mesi per intervento del sistema immunitario, ma lo stesso batterio in esseri umani immunocompromessi quali malati di AIDS o persone sottoposte a cure chemioterapiche, causa angiomasiosi bacillare e peliosi epatica, patologie nelle quali, essendo alterato il sistema immunitario, tale infezione può portare a morte.

Nella seconda parte, invece, ho condotto studi *in vitro* su cellule progenitrici endoteliali (EPC). In particolare ho effettuato una serie di studi sia morfologici che molecolari per valutare la risposta di queste cellule, considerate una nicchia primaria della *Bartonella* alla co-infezione con il *B. fragilis*.

Questo studio tende quindi ad apportare ulteriori conoscenze sull'intricata relazione tra gli organismi commensali e il sistema immunitario dell'ospite e si prefigge di identificare se il PSA possa essere una molecola immunomodulatoria con rilevanza clinica.

3.2 Modelli sperimentali

Per modello animale o modello biologico si intende un sistema biologico complesso che, contenendo vari livelli di organizzazione e obbedendo a specifiche condizioni, viene, con il suo funzionamento, utilizzato per comprenderne un altro, generalmente quello umano, con il quale, in qualche modo condivide delle affinità di comportamento per analoghe funzioni fondamentali (Ricciardi C., 1997).

Un organismo diventa un buon modello se risponde a determinati requisiti che giustificano la sua diffusione nei laboratori: deve essere economico, facile da allevare o coltivare, di dimensioni contenute, avere ciclo vitale ragionevolmente breve e non presentare particolari problemi di sicurezza. Le conoscenze ottenute da essi sono trasferibili, in misura più o meno ampia, ad altri organismi anche molto diversi, accomunati con i primi dalla storia evolutiva. Oltre a molte caratteristiche condivise, tuttavia, esistono altrettante differenze, che impongono ai ricercatori una ragionevole cautela nell'estrapolare i risultati ottenuti sui modelli biologici.

In questo studio si sono effettuati sia esperimenti *in vivo* che *in vitro*. Gli esperimenti *in vivo* sono stati effettuati utilizzando come organismo modello animale immunocompetente il topo *Mus musculus* C57BL/6J e come organismo modello animale immunocompromesso il Topo SCID/Beige. Gli studi *in vitro* sono stati invece condotti su cellule progenitrici endoteliali (EPC).

3.2.1 *Mus musculus*

Mus musculus (Linnaeus, 1758) è un piccolo roditore della famiglia dei *Muridi*, del genere *Mus*, ubiquitariamente presente in tutto il mondo. Esso è di gran lunga il mammifero da laboratorio più comunemente modificato geneticamente.

La lunghezza del corpo, coda esclusa, è di 6-12 cm, mentre quest'ultima può arrivare fino a 10 cm, questo corpo piccolo e snello gli permette di passare attraverso spazi molto esigui. Il colore del pelo varia dal bianco (albino) fino al grigio scuro o brunastro e il peso corporeo

dell'adulto è compreso tra i 20 e i 50 g. Le orecchie sono grandi e gli occhi di colore nero, ad eccezione dei topi albi in cui assumono un colore rosso dovuto all'assenza genetica di pigmentazione (fig. 3.1).



Figura 3.1: Esempio di *Mus musculus* C57BL/6J. (<http://jaxmice.jax.org>).

I topi, sono organismi modello, grazie alla facilità e velocità con la quale si riproducono, alle piccole dimensioni, al ciclo vitale molto veloce ed alla frugalità, si dimostrano utili nello studio di numerose discipline (oncologia, embriologia, genetica, tossicologia, farmacologia etc.), tanto più che essi presentano una forte omologia con l'uomo (Jennings M. et al., 1998). Il genoma del topo è stato sequenziato completamente verso la fine del 2002: la sua parte aploide misura circa 3000 megabasi ed è distribuita su 20 cromosomi. Virtualmente, ciascun gene di topo trova un omologo nel genoma umano, il che permette di effettuare esperimenti su di essi. La sperimentazione sui topi, come quella sugli altri animali, è tuttavia contestata da molti ricercatori (antivivisezionismo scientifico) che la ritengono un errore metodologico e dai sostenitori dei diritti animali (Tom Strachan et al., 1999).

In questo lavoro in particolare si sono utilizzati topi del ceppo C57BL/6J. Questo ceppo è stato creato nel 1921 da C.C. Little nel suo laboratorio al Bussey Institute for Research in Applied Biology e ad oggi è il ceppo murino più modificato geneticamente e quello preferito come organismo modello nello studio di patologie. I topi C57BL/6J hanno un colore del pelo marrone scuro, quasi nero, sono più sensibili ai rumori e agli odori e più propensi a mordere rispetto ai più docili topi BALB/c. Sono particolarmente sensibili al dolore e al freddo mentre su di essi i farmaci analgesici sono meno efficaci (Mogil J.S. et al., 1999). A differenza di altri ceppi di topi, beve bevande alcoliche volontariamente. Sono più sensibili rispetto alla dipendenza da morfina, l'aterosclerosi e alla perdita di udito legata all'età.

3.2.2 Topo SCID

I topi con grave deficienza immunitaria combinata (SCID) (fig. 3.2) sono stati scoperti nel 1983, essi risultano privi totalmente di linfociti B e T per blocco precoce della maturazione linfocitaria dai precursori midollari pertanto sono ancora più immunodeficienti dei topi nudi¹.

Tali topi presentano una mutazione sul cromosoma 16 che porta ad alterazione di un componente dell'enzima protein chinasi DNA-dipendente (DNA-PKcs), necessario per la riparazione delle rotture del DNA a doppia elica. Dati biochimici e genetici hanno rivelato che la DNA-PK è composta da una grande subunità catalitica, la DNA-PKcs e da un fattore di regolazione chiamato Ku. La subunità catalitica della proteina chinasi DNA-dipendente è una proteina serina/treonina chinasi nucleare, un enzima che nell'uomo è codificato dal gene PRKDC. La DNA-PK dei mammiferi ha dimostrato essere un componente fondamentale sia del macchinario di riparazione della rottura del DNA a doppio filamento (DSB) sia dell'apparato di ricombinazione V(D)J (Smith C.M. et al., 1999).



Figura 3.2: Esempio di topo SCID. (www.criver.com).

Il deficit enzimatico comporta alterazioni nelle giunzioni dei segmenti genici del T-cell receptor (TCR) e delle immunoglobuline (Ig) nel corso della ricombinazione dei geni dei recettori antigenici; ne consegue impossibilità di proseguire la maturazione da parte dei linfociti T e B per la mancata espressione di TCR e Ig.

La ricombinazione nei geni delle immunoglobuline è iniziata dai prodotti dei geni RAG1 e RAG2 (Recombination Activating Gene) che causano delle rotture a doppio filamento (DSB) specifiche in tali regioni geniche. La risoluzione dei DSB avviene tramite il meccanismo di

¹ **Topi nudi:** mutante senza peli scoperto nel 1962, immunodeficiente per la mancanza del timo necessario, per la produzione di linfociti T, essenziali per il sistema immunitario.

unione delle estremità non omologhe (Non-Homologous End Joining, NHEJ), un meccanismo di riparazione delle rotture a doppio filamento in cui interviene la DNA-PKcs. I topi SCID, quindi, hanno un basso numero di leucociti circolanti, dovuto all'insufficienza dei linfociti, inoltre la conta differenziale presenta una elevata proporzione di granulociti. L'ematocrito è normale e varia tra 40 e 50% (Bosma M.J. et al., 1991). Tranne per il midollo osseo, che si presenta istologicamente normale, tutti i tessuti e i siti linfoidi sono ipoplastici. Le placche di Peyer, i follicoli linfatici solitari intestinali e gli aggregati linfoidi nella sottomucosa sono quasi inesistenti. I linfonodi sono piccoli e i più sono riconosciuti per la loro struttura stromale di base e il modello dei seni. Nella milza, i follicoli linfoidi e i centri germinali sono sostituiti da "strutture nodulari", che consistono principalmente di elementi cellulari stromali e variabili proporzioni di macrofagi e grandi cellule granulari. Cellule linfoidi e occasionali plasmociti sono a volte notate. Alcuni topi presentano un'ampia milza, indicativa di anemia o infezione. In alcuni casi, la polpa è quasi interamente occupata da globuli rossi nucleati, altri casi presentano invece notevole granulocitosi e megacariocitosi con strutture nodulari rendendola difficilmente identificabile (Deschryver-Kecskemeti K. et al., 1988).

La SCID nei topi è ereditata come tratto autosomico recessivo e nonostante questi topi siano altamente suscettibili a infezioni opportunistiche, possono essere tenuti in ambienti che minimizzano la loro esposizione agli agenti patogeni ed essere quindi mantenuti in vita per più di un anno di età. Un fenomeno immunologico interessante, sebbene poco chiarito, nei topi con età superiore ai sei mesi, affetti da SCID, è la capacità di produrre piccole quantità di immunoglobuline e pochi linfociti T maturi. Questo fenotipo è noto come "leaky SCID" (letteralmente SCID gocciolante). I topi avendo meccanismi di riparazioni del DNA deficienti, presentano un'aumentata suscettibilità al danno da radiazioni.

I tumori da altre specie possono essere facilmente trapiantati in topi SCID dove crescono senza essere respinti, inoltre, i topi SCID sono ideali per la crescita di ibridomi *in vivo* per la produzione di un approvvigionamento continuo di anticorpi (Ab).

3.2.3 Cellule progenitrici endoteliali

Le cellule progenitrici endoteliali (EPC) sono cellule presenti all'interno del midollo osseo simili ad angioblasti embrionali, derivano dalla linea mesodermica e hanno l'emangioblasto come precursore in comune alle HSC (Ribatti D. et al., 2002) e alle cellule muscolari lisce

(Bailey A.S. et al., 2004), anche se è stato dimostrato che possono anche originare dalla linea monocito/macrofagica (Rehman J. et al., 2003) (fig. 3.3).

Dal 1997 sono state individuate nel circolo ematico periferico (Asahara T. et al., 1997a). Le EPC sono cellule in grado di migrare, proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature e di determinare come nelle patologie neoplastiche la formazione di nuovi vasi sanguigni anche nel periodo post-natale (Peichev M. et al., 2000) e quindi sono fondamentali per la rigenerazione tissutale post-ischemica/necrotica. Sono inoltre in grado di mantenere l'integrità funzionale e l'omeostasi dei vasi mediante riendotelizzazione post-traumatica (Asahara T. et al., 1997b).

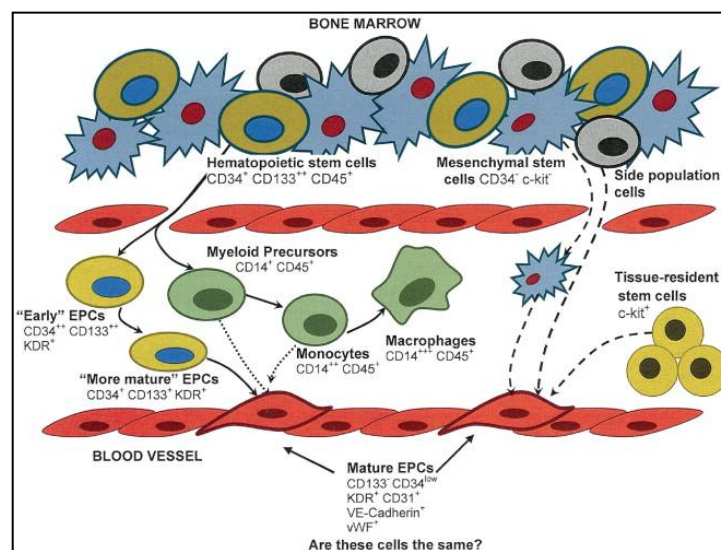


Figura 3.3: Potenziale origine e differenziazione di cellule progenitrici endoteliali. (Shantsila E. et al., 2007).

Visto che l'endotelio previene eventi trombotici, riduce l'aggregazione di leucociti e piastrine, garantisce l'integrità funzionale dei vasi (Libby P., 2000) e considerando che le cellule endoteliali mature hanno un basso potenziale proliferativo e la loro capacità di sostituire l'endotelio danneggiato è molto scarsa, è chiaro il ruolo fondamentale che le EPC possono assumere in futuro.

Le EPC risiedono principalmente nel midollo osseo in stretta associazione con le HSC, lo stroma midollare e i fibroblasti, costituendo il microambiente ematopoietico. Le CD34⁺ sono il 3% delle cellule del midollo osseo, mentre nel circolo periferico sono lo 0,01-0,05% di tutte le cellule mononucleate (Shintani S. et al., 2001).

Il numero delle EPC è inversamente correlato all'età, probabilmente per la fisiologica riduzione dell'attività del midollo osseo, mentre gli estrogeni (Strehlow K. et al., 2003),

l'esercizio fisico intenso (Steiner S. et al., 2005) e l'ipossia ne inducono l'aumento. E' stato dimostrato inoltre che il numero di EPC circolanti varia in maniera dipendente dal tempo. Pertanto, a seconda di quando si verifica il campionamento, il numero delle EPC e le loro funzioni possono essere differenti (Lee L.C. et al., 2010).

E' difficile identificare le EPC con parametri fissi, soprattutto sia perché originano da precursori multipli sia perché esprimono un'ampia varietà di markers tipici della linea endoteliale con differente intensità a seconda della fase maturativa nella quale si trovano: precoce (EPC circolanti precoci o early EPC) con caratteristiche molecolari e ultrastrutturali più simili ai monociti o tardiva (EPC circolanti o late EPC) con caratteristiche molecolari e ultrastrutturali più simili alle cellule endoteliali (Medina R.J. et al., 2010).

I markers di superficie che individuano il fenotipo cellulare delle EPC sono il CD34, tipico di molte cellule midollari staminali, il recettore del fattore di crescita vascolare (VEGFR-2/flk-1/KDR) tipico marker delle cellule endoteliali mature e il CD133 (AC133, c-kit) indice di immaturità cellulare (Peichev M. et al., 2000) poiché compare sulla membrana cellulare precocemente per poi scomparire con la maturazione (Urbich C. et al., 2004).

Durante la maturazione le cellule acquisiscono markers fenotipici caratteristici della linea endoteliale matura, quali: CD31⁺, PECAM1, fattore di Von Willebrand, la sintesi dell'ossido nitrico (eNOS), caderina, E-selectina e lipoproteine acetilate a basso peso molecolare (ac-LDL) (Medina R.J. et al., 2010).

Queste cellule presentano caratteristiche sia ematopoietiche e quindi coltivate con particolari fattori di crescita sono in grado di formare colonie (eCFU) (Handergritenger R. et al., 2003), sia tipiche delle cellule endoteliali, cioè la capacità di formare nuovi capillari, produrre NO e dare origine a colonie tardive di crescita con caratteristico aspetto affusolato (spindle shaped) e "acciottolato" (cobblestone) simile all'endotelio (Hill J.M. et al., 2003).

Vi sono, però, studi (Rehman J. et al., 2003) che sottolineano come anche la linea mieloide/monocitica (CD14⁺/CD34⁻) possa differenziarsi (o transdifferenziarsi) nella linea endoteliale. L'espansione in vitro di cellule CD14⁺, in determinate condizioni, infatti, favorisce la differenziazione in cellule endoteliali che possono, in vivo, migliorare la vascolarizzazione (Urbich C. et al., 2003).

La capacità di differenziazione in cellule endoteliali mature (EC) si ritiene appartenere anche alla linea di derivazione mesenchimale (MSC) (Oswald J. et al., 2004) e in particolare alle

cellule progenitrici adulte multipotenti (MAPC). Mediante transdifferenziazione, quindi, tutte le cellule staminali derivanti dalla linea mesodermica e dal precursore comune, possono differenziarsi in EC. Ulteriori studi hanno messo in evidenza che anche le cellule staminali residenti possono dare origine a EC (Beltrami A.P. et al., 2004).

La perdita di CD133/CD14 e l'espressione di markers specifici come il fattore di Von Willebrand, che indicano maturità cellulare, avvengono durante la migrazione dalla periferia al monostrato endoteliale ed è fondamentale il ruolo dei fattori di crescita, quali il VEGF e i suoi recettori, il cui incremento coincide con la migrazione delle EPC nei siti di danno vascolare (Gill M. et al., 2001).

Le EPC vengono reclutate nell'organo interessato tramite quattro fasi, mediate da citochine, chemochine e fattori di crescita, ovvero: il rilascio dal midollo osseo o reclutamento, la mobilizzazione nel circolo sanguigno, la localizzazione nel sito interessato (homing) e la differenziazione in cellule endoteliali mature e/o cardiomiociti (Papayannopolus T., 2004).

La mobilizzazione delle cellule staminali dal midollo osseo verso i vasi sanguigni del microambiente midollare richiede inoltre l'attivazione della metalloproteinasi 9 della matrice (MMP-9), che promuove la solubilizzazione di un recettore per le citochine presente sulla membrana delle cellule staminali (il ligando di Kit di membrana o mKit). Solo le cellule staminali positive per il ligando di Kit citoplasmatico (cKit) sono in grado di attraversare la parete dei sinusoidi del midollo osseo (Heissig B. et al., 2002). Questa migrazione potrebbe rappresentare inoltre lo stimolo di attivazione della cellula da uno stato quiescente ad uno proliferativo grazie all'azione del ligando di Kit sull'attivazione del ciclo cellulare (fig. 3.4).

Il G-CSF è ampiamente utilizzato in ambito ematologico, assieme al fattore di crescita granulocitario (GM-CSF), per l'espansione e la raccolta di cellule ematopoietiche e nel trapianto di midollo osseo (Takahashi T. et al., 1999).

Un altro fattore di crescita essenziale è il VEGF di cui ne esistono isoforme circolanti multiple, la più frequente è VEGF165, il cui effetto biologico è permesso dal suo legame con recettori tirosinchinasici di superficie (VEGFR1-2 detto anche Flk-1 o KDR) e dall'attivazione di MMP-9.

Molti fattori sono implicati in questo processo e utilizzati come agenti mobilizzatori di cellule staminali migliorandone la funzionalità tra cui lo stromal derived factor-1 (SDF-1), elemento chiave nella mobilizzazione e ritenuto l'elemento che protegge le EPC dall'apoptosi

(Yamaguchi J. et al., 2003); il fattore di crescita fibroblastico (FGF), il fattore di crescita placentare, che ha vari ruoli nella cascata di attivazione delle cellule staminali (Hattori K. et al., 2002), tra i quali l' up-regolazione dell'attività delle MMP-9 e ancora l'eritropoietina (Bahlmann F.H. et al., 2004) e la sintesi costitutiva endoteliale dell'ossido nitrico (eNOS), la cui assenza produce un deficit funzionale e numerico di cellule staminali nei topi (Aicher A. et al., 2003). Il rilascio in circolo di questi fattori è indotto da vari stimoli, tra cui l'ischemia tissutale.

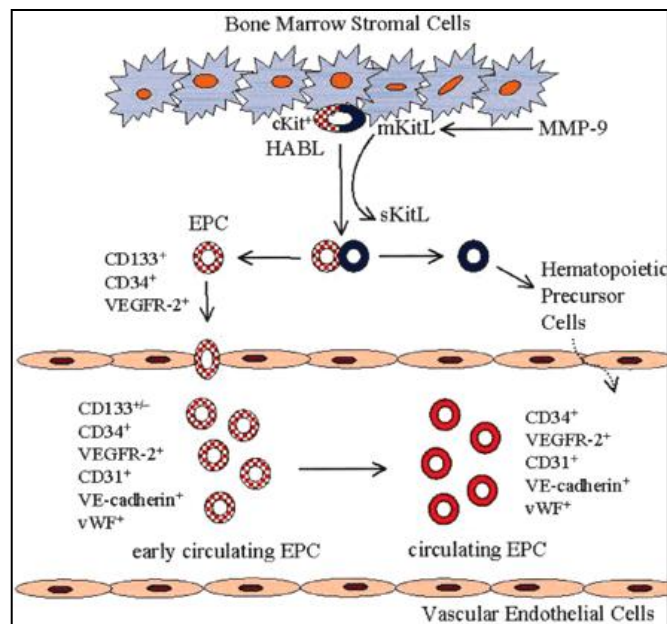


Figura 3.4: Processo di mobilizzazione delle EPC dal midollo osseo regolato da vari fattori. (Hristov M. et al., 2003).

La mobilizzazione delle EPC necessita dell'attività di vari fattori. Primo fra tutti le integrine di membrana, in particolare le $\beta 2$ (CD18-11) e le $\alpha 4\beta 1$, che permettono l'interazione cellula-cellula, essenziale nei processi di neovascolarizzazione (Hattori K. et al., 2001). Le principali integrine che regolano il mantenimento delle EPC nel microambiente del midollo osseo sono $\alpha 4$ e $\beta 3$. Le integrine $\alpha 4$ hanno un ruolo essenziale nell'embriogenesi, nell'emopoiesi e nell'adesione a VCAM-I e promuovono interazioni adesive tra le EPC e le cellule stromali del BM. Le integrine $\beta 3$ hanno un ruolo essenziale nell'angiogenesi e nell'emostasi. Studi recenti sia *in vitro* che *in vivo* (in modelli di topo knockout condizionali o integrina-null) hanno dimostrato che inibendo la disponibilità delle integrine $\alpha 4$ e $\beta 3$ si ha una maggiore mobilizzazione delle EPC dal midollo al circolo (Qin G. et al., 2006). $\alpha 6\beta 1$ un integrina che promuove l'homing delle EPC ai siti ischemici e il rimodellamento vascolare, si è visto essere

essenziale per l'omeostasi della pelle e per regolare la formazione del lume endoteliale (Bouvard C. et al., 2010). Si tratta di una integrina che lega la laminina ed è regolata da fattori quali il VEGF e bFGF, ovvero i maggiori fattori di crescita che regolano la guarigione delle ferite (Smadja D.M. et al., 2007).

Oltre ai fattori per il reclutamento inducono la mobilitazione delle EPC anche gli inibitori dell'HMG-CoA che, sia *in vitro* sia in vivo, aumentano la capacità funzionale delle EPC (Vasa M. et al., 2001). Alcuni studi hanno evidenziato una riduzione delle EPCs indotta dalla proteina C reattiva; si suppone che ciò dipenda dall'inibizione di e-NOS (Aicher A. et al., 2003).

L'attivazione del trasduttore transmembrana della sintasi di NO è implicato anche nei meccanismi che fanno dell'eritropoietina e degli estrogeni dei potenti stimoli di mobilitazione delle EPC e di formazione di nuove colonie.

Considerando il numero esiguo di EPC, il fenomeno di chemiotassi è fondamentale per richiamare un numero adeguato di cellule nel tessuto interessato. Lo stromal derived factor 1 (SDF-1), un importante fattore chemotattico, interagisce con le EPC legando il recettore di superficie CXCR-4 (Mohle R. et al., 1998) prendendo parte al processo di differenziazione.

Le altre principali chemochine e i rispettivi recettori che regolano l'attivazione delle EPC e l'homing sono l'interleuchina 8 (IL-8) e CXCR2, GRO- α e CXCR1, CCL5 e CCR5 e infine, chemioquina C-C e recettore 2 e 5 per la chemioquina con motivo C-C (Ishida Y. et al., 2012).

Una volta giunte nel sito in cui il tessuto deve essere riparato, le EPC contribuiscono alla nuova formazione dei vasi in diversi modi: incorporandosi direttamente nei nuovi vasi, differenziandosi in EC mature e producendo segnali paracrini/autocrini. Il processo di differenziazione delle EPC in EC comprende l'adesione integrine-mediata delle EPC ai componenti della matrice extracellulare (ECM), in particolare, alla fibronectina, seguita dal fattore di crescita che induce proliferazione e sopravvivenza (Hynes R.O., 2009). La riendotelizzazione avviene per mezzo delle vitronectine e dei rispettivi recettori ($\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$) che mediano l'adesione delle EPC al vaso danneggiato. $\alpha 5\beta 1$ altamente espresso sulla membrana delle EPC favorisce il legame di queste cellule alla fibronectina esposta sui vasi.

Le EPC producono molteplici fattori di crescita che hanno effetti paracrini quali VEGF, SDF-1, insulino like growth factor 1, monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 1a e il fattore di crescita derivato dalle piastrine. Insieme, questi fattori

possono agire su diversi tipi cellulari portando ad una risposta globale che promuove l'angiogenesi e la rigenerazione tissutale (Caiado F. et al., 2008) (fig. 3.5).

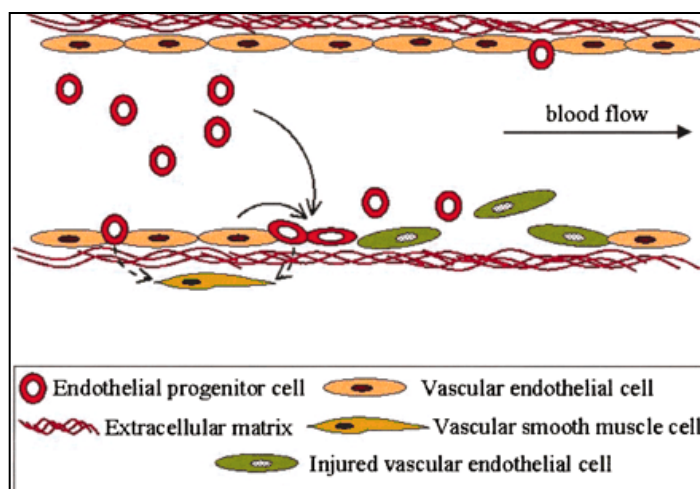


Figura 3.5: Riparo dei vasi danneggiati da parte delle EPC. (Hristov M. et al., 2003).

Il numero e l'attività funzionale delle EPC sono ridotti in soggetti con fattori di rischio cardiovascolare (Vasa M. et al., 2001) mentre si registra un aumento dei livelli ematici di EPC associato ad una riduzione del rischio di morte per cause cardiovascolari ed eventi cardiovascolari maggiori (Werner N. et al., 2005). Recenti studi dimostrano che l'IL-10 ha un effetto diretto sulle EPC. L'IL-10, infatti aumenta il mantenimento e la disponibilità numerica di queste cellule a partecipare alla guarigione delle ferite. Per cui l'IL-10 ha anche un ruolo angiogenico oltre ad essere un immunoregolatore noto, nel miglioramento terapeutico dell'angiogenesi EPC-mediata nella guarigione delle ferite (Krishnamurthy P. et al., 2011).

Il ruolo delle EPC nella riparazione dei tessuti nei diabetici è stato molto studiato. Le EPC presentano sia nel diabete di tipo 1 che di tipo 2, ridotte o alterate funzioni, tra cui disturbi della mobilizzazione, della proliferazione, del profilo di espressione delle integrine, di adesione alla matrice extracellulare, di incorporazione nei vasi sanguigni e di differenziazione (Kim K.A. et al., 2012). Le EPC dei diabetici mostrano ridotta capacità secretoria paracrina angiogenica e alterata risposta a stimoli attivanti che contribuiscono all'alterato reclutamento delle EPC per la re-endotelizzazione dopo il danno vascolare nel diabete (Callaghan M.J. et al., 2005). Diversi studi suggeriscono che i numeri EPC nel diabete può diminuire a causa di un aumento dell'apoptosi per cui una terapia a base di EPC con l'aumento sinergizzato di tutte le funzioni delle EPC può fornire benefici terapeutici per le ferite diabetiche (Madonna R. et al., 2011).

Il numero di EPC è ridotto nei pazienti coronaropatici (Liguori A. et al., 2008) e l'angiografia dimostra che tale numero risulta diminuito con la progressione della coronaropatia (Briguori C. et al., 2010) e se tali soggetti sono sottoposti a trapianto cardiaco, hanno un ridotto numero di EPC (Simpler D. et al., 2003), l'insufficienza renale cronica inibisce di più del 50% la capacità funzionale delle EPC (Choi J.H. et al., 2004).

Traumi vascolari severi come l'ischemia acuta degli arti inferiori, interventi di by-pass aorto/coronarico o estesi danni vascolari post-traumatici (ustioni) inducono un rapido e consistente incremento del numero di cellule esprimenti VEGFR-AC133, VE e caderina, in correlazione con VEGF (Gill M. et al., 2001).

L'incremento di EPC in corso di eventi vascolari traumatici potrebbe costituire un tentativo di risposta compensatoria teso alla formazione di nuovi capillari cardiaci (Quaini F. et al., 2002). Inizialmente la necrosi pareva il solo stimolo capace di indurre mobilitazione delle EPC, ma si è visto che anche la sola ischemia può indurre tale fenomeno (Rehman J. et al., 2004).

Visto il ruolo cruciale svolto dalle integrine nel modulare aspetti biologici e funzionali delle EPC, negli ultimi anni si sta pensando di manipolare l'interazione tra le integrine delle EPC con la matrice extracellulare mediante approcci di ingegneria tissutale per promuovere la funzione delle EPC e il riparo dei tessuti ad essa associata (Cho H. et al., 2012).

3.3 Organi modello

In questo studio sono stati esaminati morfologicamente e ultrastrutturalmente in seguito a prelievo da topi sia il fegato che l'aorta in quanto organi bersaglio dell'infezione da *B. henselae* (Regnath T.H. et al., 1998; Chiaraviglio L. et al., 2010; Karris M.Y. et al., 2011).

3.3.1 Fegato

Sia nell'uomo che nel topo, il fegato è un organo essenziale per la trasformazione dei nutrienti, la produzione di proteine, l'omeostasi energetica e la disintossicazione. I nutrienti arrivano al fegato nel sangue che li raccoglie insieme alle tossine provenienti sia dai batteri intestinali che da altre fonti dal tratto gastrointestinale, tramite la vena porta (Rogers A.B. and Dintzis R.Z., 2012).

Le funzioni fisiologiche sono simili in entrambi gli organismi, anche se ci sono alcune differenze che si riflettono a livello morfologico. Ad esempio, i topi conservano rapidamente

il glucosio da un pasto recentemente ingerito sottoforma di glicogeno negli epatociti centrolobulari. Questo aumenta il potenziale osmotico citoplasmatico, con conseguente maggiore assorbimento di acqua accompagnato da compensazione citoplasmatica con eosinofilia più chiara. Questo cambiamento normale è a volte indicato come "degenerazione idropica".

I topi trattati, inoltre, con composti metabolizzati attraverso PPAR- α sono altamente suscettibili alla formazione di tumori al fegato, mentre gli esseri umani assumono regolarmente farmaci agonisti di PPAR- α per migliorare il loro profilo lipidico con pochi effetti collaterali.

A livello strutturale (Rogers A.B. and Dintzis R.Z., 2012), il fegato umano mostra distinti cordoni di una singola fila di epatociti disposti dalla triade portale alla vena centrolobulare, mentre nei topi gli epatociti si dispongono in maniera omogenea, in particolare nelle zone intermedie e centrolobulari.

Di importanza nei modelli di danno epatico è il fatto che i topi hanno meno tessuto connettivo degli umani sia in salute che nella malattia. Gli spessi fasci di collagene e le aree multifocali di rigenerazione nodulare caratteristiche della cirrosi umana in genere non si evidenziano nei topi, anche in seguito a grave danno epatico. Tali differenze si devono tener presente quando si usano i topi come modelli di danno epatico farmaco-indotto.

Anche la composizione dei sali biliari è specie-specifica. Tuttavia, dato che le somiglianze sia nella struttura che nelle funzioni tra i fegati delle due specie superano le differenze, il topo rimane un ottimo modello ed è ampiamente utilizzato per lo studio di malattie epatobiliari umane.

Il fegato umano pesa circa 1500 g e rappresenta circa il 2% del peso totale del corpo, per cui è la ghiandola più grande del corpo. Si trova sotto il diaframma sul lato destro della cavità addominale (fig. 3.6) e presenta quattro lobi non completamente separati (fig. 3.7). Sulla superficie anteriore vi sono il lobo destro e sinistro; sulla superficie viscerale, il lobo caudato e il lobo quadrato situato tra i lobi destro e sinistro. Il lobo quadrato è separato dal lobo caudato dalla porta epatica, o ilo del fegato, la regione in cui la vena porta e l'arteria epatica entrano nel fegato e esce il dotto epatico. Le vene epatiche che portano il sangue dal fegato emergono dal lobo caudato e si riversano quasi direttamente nella vena cava inferiore. Questo attaccamento delle vene epatiche verso la vena cava inferiore consente di assicurare

il fegato nella cavità addominale superiore. I legamenti peritoneali sono punti di riferimento riconoscibili sulla superficie del fegato. I più importanti di questi sono il legamento falciforme, tra i lobi destro e sinistro e il legamento coronario, che attacca il fegato alla superficie inferiore del diaframma.

Il fegato del topo pesa circa 2 g, all'incirca il 6% del peso corporeo e occupa gran parte della cavità addominale estendendosi sull'intera regione sottodiaframmatica (fig. 3.6). I legamenti addominali che delineano i lobi del fegato umano non sono evidenti nel topo. I quattro lobi del fegato del topo sono designati come destro, mediale, sinistro e caudato (fig. 3.7). Il lobo sinistro è il più grande ed è un sito frequente di campionamento per l'esame istologico. La circolazione del sangue del topo è simile a quella umana.

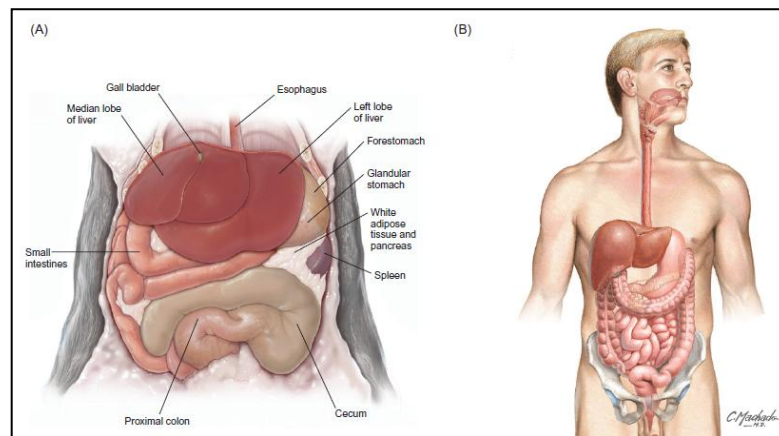


Figura 3.6: Anatomia regionale. (A) Il fegato del topo occupa tutta la regione sottodiaframmatica dell'addome e non presenta legamenti di superficie. (B) Il fegato umano occupa il quadrante superiore destro della cavità addominale settato principalmente a livello del lobo destro dal legamento falciforme. (Elsevier, Inc. www.netterimages.com).

Nella maggior parte delle specie, gli epatociti sono disposti in quello che è descritto come "lobulo epatico classico". Questi sono strutture poligonali con più spazi portalì alla periferia e una vena centrale. Il fegato umano contiene all'incirca 1 milione di lobuli. Il sangue e la bile viaggiano in direzioni opposte: il sangue misto arterioso e venoso si muove dalle regioni portalì alla vena centrale attraverso i sinusoidi, mentre la bile secreta nei canalicoli è diretta alle regioni portalì da microvilli epatocellulari specializzati. Colonne di epatociti si estendono dalla regione portale alla vena centrale. Gli spazi tra le colonne, contengono sinusoidi epatici o "capillari" del fegato. Le pareti dei sinusoidi sono ridotti al minimo, con fenestrature e grandi discontinuità tra le cellule endoteliali. Tra il sinusoidi e l'epatocita c'è lo spazio

pericapillare di Disse, in cui il plasma sanguigno è in contatto diretto con gli epatociti, permettendo il libero scambio di macromolecole.

I macrofagi residenti, le cosiddette cellule di Kupffer, proiettano nel lume del sinusoidale. Essi costituiscono uno dei principali filtri per le particelle estranee entrate nel fegato e costituiscono circa il 15% delle cellule epatiche totali. Le cellule di Ito conosciute anche come cellule *stellate* epatiche, hanno come funzione principale quella di immagazzinare vitamina A, inoltre ci sono un gran numero di cellule T e NK coinvolte nella sorveglianza immunitaria. Le cellule immunitarie associate ai sinusoidi e le cellule stellate epatiche non sono facilmente individuabili con la colorazione emallume/eosina.

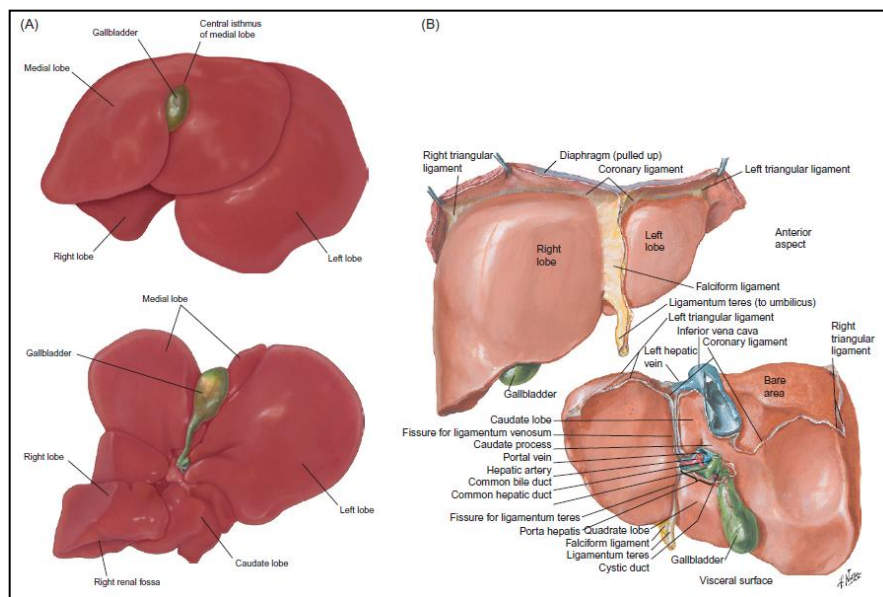


Figura 3.7: (A) Il fegato del topo presenta quattro lobi: sinistro, destro, mediale a caudale. La cistifellea si trova sotto l'istmo centrale del lobo mediale se visto ventralmente. (B) Il fegato umano anche presenta quattro lobi: destro, sinistro, caudato e quadrato. Presenta inoltre molti legamenti di superficie. (Elsevier, Inc. www.netterimages.com).

Il fegato è circondato da una capsula di collagene, la capsula di Glisson e il tessuto connettivo capsulare è continuo con lo stroma interno del fegato all'ilo. Le strutture epatiche portalie umane sono supportate da una moderata quantità di collagene e da sottili fibre reticolari (comprensivi di collagene di tipo III) che formano una rete a maglie larghe che sostiene i sinusoidi. A causa delle loro dimensioni e del tessuto connettivo associato, le regioni portalie nel fegato umano sono evidenti anche a basso ingrandimento.

In un uomo sano, c'è poca differenza di intensità di colorazione tra gli epatociti nelle zone acinari 1 (periportale), 2 (zona media) o 3 (centrolobulare). Sebbene chiamate "triadi portalie", le regioni portalie presentano in realtà quattro componenti: arteriole, venule, dotti

biliari e vasi linfatici. Le regioni medie sono composte di colonne di epatociti parallele e interdigitate. Gli epatociti centrolobulari (zona 3) hanno tensione di ossigeno minima e sono un frequente target di lesioni ossidative tossiche, che possono contribuire alla maggiore presenza di lipofuscine marroni in epatociti e di cellule di Kupffer. Le lipofuscine, pigmenti dell'invecchiamento o di usura e lacerazione, sono composte di detriti cellulari indigeribili che si accumulano nel corso degli anni anche nel cervello e nel cuore in adulti più anziani. Sebbene la maggior parte degli epatociti hanno un nucleo, non è raro trovarli binucleati o polinucleati. Infatti, le cellule binucleate possono rappresentare fino al 25% della popolazione degli epatociti.

I canalicoli biliari sono spazi minuti tubulari tra gli epatociti che ricevono la bile secreta dagli epatociti. Le pareti di questi canalicoli sono composte dalle membrane plasmatiche di epatociti adiacenti. Giunzioni strette sigillano i canalicoli biliari dalle strutture circostanti. Questi canalicoli attraversano il lobulo e si riversano nei minuscoli dotti chiamati canali di Hering, che forniscono bile ai dotti biliari situati negli spazi portalari perifericamente al lobulo in maniera controcorrente al flusso sanguigno. I dotti biliari si uniscono in dotti biliari interlobulari progressivamente più grandi, formando alla fine i dotti epatici sinistro e destro che riversano il loro contenuto nella cistifellea. La cistifellea serve come sito di immagazzinamento della bile fino a quando non riversa il suo contenuto attraverso il dotto biliare comune nell'intestino tenue sotto lo stimolo di un enzima digestivo, la colicistochinina.

L'architettura lobulare nei topi (Rogers A.B. and Dintzis R.Z., 2012) è simile a quella degli esseri umani. Tuttavia, a causa della sua piccola dimensione e della diminuzione della quantità di tessuto connettivo, le regioni portalari difficilmente si evidenziano nelle sezioni istologiche. Anche dopo un grave infortunio, i topi non sviluppano la cirrosi classica caratterizzata da spesse bande di collagene che collegano le vene portalari e centrale. Colorazioni speciali per il collagene, come la tricromica di Masson, possono essere richieste per rilevare e quantificare relativamente modesti aumenti nella fibrosi che si verificano nel danno epatico in modelli murini. Inoltre, i cordoni epatici che si estendono per la lunghezza del lobulo non sono così evidenti nei topi come negli esseri umani, soprattutto nelle zone 2 e 3. Infatti, la segregazione degli epatociti nel topo in lastre distinte possono indicare restringimento cellulare associato con l'anoressia o stati di malattia. In un topo che ha

mangiato un pasto di recente, l'architettura lobulare si può meglio discernere tramite colorazione emallume/eosina. Gli epatociti centrolobulari infatti appariranno chiari a causa della imbibizione dell'acqua in associazione con l'accumulo di glicogeno. Le popolazioni di cellule accessorie, quali cellule di Kupffer, cellule stellate epatiche, cellule T e NK, sono simili a quelle umane.

3.3.2 Aorta

Il sistema vascolare si divide in: arterie, arteriole, capillari, venule e vene. Nei topi fatta eccezione per le dimensioni dei vasi che sono notevolmente più piccoli, l'anatomia microscopica è simile a quella dell'uomo. I componenti della parete del vaso sono fondamentalmente le stesse, ma i topi hanno meno strati (Laflamme M.A. et al., 2012).

Vi si distinguono tre strati concentrici: (1) una lamina interna, la tonaca intima, di natura endoteliale, le cui cellule pavimentose di norma hanno l'asse orientato longitudinalmente; (2) una lamina intermedia, la tonaca media, composta soprattutto da cellule muscolari lisce orientate trasversalmente; (3) un rivestimento esterno, la tonaca avventizia, costituito da fibroblasti e da fibre collagene associate, orientate per la maggior parte in senso longitudinale. La lamina esterna si fonde gradualmente con il tessuto connettivo lasso situato intorno al vaso. Il confine tra tonaca intima e tonaca media è segnato dalla lamina elastica interna, particolarmente sviluppata nelle arterie di medio calibro. Tra la tonaca media e l'avventizia si riscontra anche in molte arterie una più sottile lamina elastica esterna (fig. 3.8) (Rhodin J.A.G., 1980).

Le arterie sono classificate di norma in arterie elastiche (di conduzione) e arterie muscolari (di distribuzione) e arteriole, a seconda delle dimensioni della componente predominante nella tonaca media e della loro principale funzione.

L'aorta è provvista di pareti costituite, nella tonaca media, da numerose lamine fenestrate di elastina. Questo importante vaso di conduzione si distende durante la contrazione del cuore (sistole) e il successivo ritorno elastico delle pareti durante la diastole funge da pompa sussidiaria che serve a mantenere costante il flusso nonostante l'intermittenza del battito cardiaco (compliance arteriolare).

La tonaca intima dell'aorta è costituita da endotelio, un sottile epitelio pavimentoso separato dalla lamina elastica interna da tessuto connettivo lasso contenente pochi

fibroblasti, sporadiche cellule muscolari lisce e fibrille di collagene. Il tessuto connettivo subendoteliale è raramente visto nei topi. L'endotelio fornisce al vaso un rivestimento liscio e una barriera di diffusione parzialmente selettiva tra sangue e tonaca avventizia del vaso sanguigno. Le sue cellule mostrano un contorno poligonale; nell'uomo la loro larghezza è di 10-15 μm la lunghezza di 25-50 μm e il loro asse maggiore è orientato longitudinalmente.

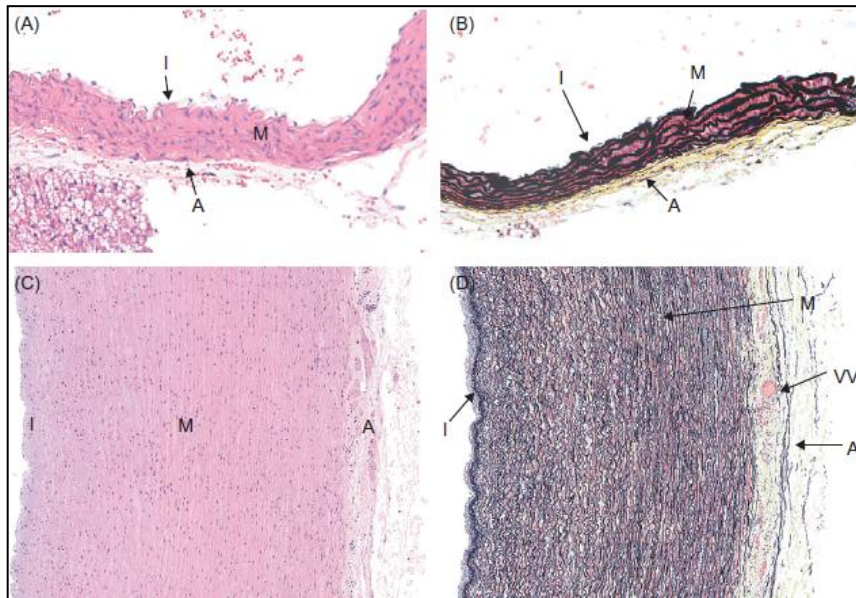


Figura 3.8: Aorta di topo (A-B) e umana (C-D). (A-B) Aorta di topo colorata con emallume/eosina (A) e colorazione pentacromatica di Movat (B). L'aorta è un'arteria elastica composta da tonaca intima (I) uno strato appiattito di endotelio; la tonaca media (M), uno strato di fibre elastiche e cellule muscolari lisce; e la tonaca avventizia (A) con tessuto connettivo fibroso. Nel topo adulto non ci sono più di una decina di lamelle elastiche. (C-D) Aorta di uomo colorata con emallume/eosina (C) e colorazione pentacromatica di Movat (D). Le caratteristiche istologiche dell'aorta umana sono simili a quelle del topo ma l'aorta umana ha più lamelle elastiche (~50) e vasa vasorum più evidenti (VV). (Laflamme M.A. et al., 2012).

Cellule endoteliali adiacenti prendono contatto tra loro tramite semplici giunzioni occludenti e sporadiche giunzioni comunicanti. Le cellule contengono tutti i comuni organelli, di solito posti sulla regione più spessa del citoplasma, intorno al nucleo appiattito e situato in posizione centrale. Le cellule endoteliali si rinnovano lentamente e solo di rado appaiono in mitosi. Le loro membrane rivolte rispettivamente verso il lume e verso le altre tonache sono provviste di numerose vescicole che si presume siano coinvolte nel trasporto transendoteliale di acqua, elettroliti e alcune macromolecole. Talora brevi e tozzi processi si estendono dalla base delle cellule endoteliali attraverso le fenestrate della lamina elastica interna stabilendo giunzioni con le cellule muscolari lisce della media.

Al microscopio elettronico, nell'endotelio dell'aorta si osservano inclusioni citoplasmatiche bastoncellari dette corpi di Weibel-Palade, dal nome dei citologi che per primi le descrissero, si tratta di strutture delimitate da membrana con diametro nell'uomo di circa 0,1 μm e lunghe fino a 3 μm che contengono elementi tubulari di composizione non ancora nota e situati in una matrice moderatamente densa. Sono la sede di accumulo del fattore di von Willebrand, una glicoproteina molto voluminosa sintetizzata in tutto il sistema vascolare dalle cellule endoteliali, ma depositata all'interno dei corpi di Weibel-Palade soltanto negli endoteli arteriosi. Tale fattore viene secreto di continuo nel plasma sanguigno e rappresenta una delle componenti principali dell'aggregazione e dell'adesione piastrinica, ovvero serve a formare un coagulo nei punti di lesione nella parete dei vasi. La sua assenza congenita provoca la malattia di von Willebrand caratterizzata da tempi di coagulazione prolungati e da sanguinamento eccessivo dopo una lesione (Weibel E.R & Palade G.E., 1964).

La tonaca media è costituita da lamelle multiple concentriche e fenestrate di elastina, che si alternano con sottili lamine di cellule muscolari lisce disposte circolarmente e da fibre collagene e di elastina poste in una matrice di proteoglicani extracellulari. Le lamelle elastiche e le altre componenti extracellulari vengono secrete dalle cellule muscolari lisce. La lamina elastica interna è meno evidente rispetto alle arterie muscolari, in quanto rappresenta semplicemente la più interna tra le molteplici lamine elastiche della parete; queste ultime, nell'adulto, possono ammontare a 50 e oltre nell'aorta toracica e raggiungere il numero di 30 nell'aorta addominale mentre sono molto di meno nell'aorta del topo. La configurazione tridimensionale delle componenti elastiche della parete vascolare è difficile da visualizzare nelle sezioni istologiche. È tuttavia possibile rimuovere tutte le altre componenti con acido formico caldo ed esaminare l'elastina, che non viene estratta, usando il microscopio elettronico a scansione (SEM) (Fujiwara T. & Uehara T., 1982). In queste preparazioni è evidente che le lamelle elastiche dispongono di fenestrature relativamente ampie, variabili per forma e dimensioni e che le lamelle in successione sono unite fra loro da sottili fasci di elastina. A causa della predominanza di elastina nelle grandi arterie elastiche, le fibrocellule muscolari lisce rappresentano soltanto una frazione relativamente piccola della tonaca media. Nell'aorta di coniglio, la componente muscolare liscia costituisce solo il 35% del volume della parete, mentre rappresenta invece il 74% del volume dell'arteria tibiale, che è un'arteria di distribuzione.

La tonaca avventizia è piuttosto sottile ed è costituita da fibroblasti, da fasci longitudinali di fibre collagene e da un lasso reticolo di sottili fibre elastiche. Le pareti delle arterie elastiche maggiori sono troppo spesse per poter essere nutrite per diffusione dal lume del vaso. Queste arterie dispongono al loro interno di una micro vascolarizzazione, costituita da piccoli vasi detti vasa vasorum che si ramificano sulla superficie dei vasi di diametro maggiore formando nell'avventizia una rete dalla quale i capillari penetrano nella parte esterna della media. Non si conosce ancora con esattezza la profondità alla quale i capillari si spingono, ma è probabile che almeno la metà esterna e forse i due terzi della parete ricevano sostanze nutritive e ossigeno dai vasa vasorum. Tuttavia una parte considerevole dello spessore della parete, dipende, per la nutrizione, dalla diffusione e dal lume. Si ritiene che la fenestrazione delle lamelle elastiche faciliti la diffusione di sostanze nutritive. Il sangue viene poi drenato in piccole vene che confluiscono in vene adiacenti di dimensioni maggiori. Nei topi, i vasa vasorum sono raramente osservati solo nell'avventizia dell'aorta (Rhodin J.A.G., 1980).

CAPITOLO 4

Materiali e metodi

4.1 Ceppi batterici e condizioni di crescita

I ceppi batterici utilizzati in questo lavoro sono *Bartonella henselae* ATCC49882 (LGC Promochem), *Bacteroides fragilis* NCTC9343 e la sua forma mutante priva del polisaccaride A *B. fragilis* Δ PSA.

B. henselae ATCC49882 è conservato a -80°C in brodo di soia triptico (TSB) (Oxoid) fino all'utilizzo e cresciuto su terreno agar Columbia integrato con 5% di sangue di montone defibrinato (Oxoid) in atmosfera umidificata a 37°C e 5% di CO₂ per sette giorni.

B. fragilis NCTC9343 e la sua forma mutante *B. fragilis* Δ PSA sono stati gentilmente forniti dal Prof. Dennis L. Kasper del Dipartimento di Microbiologia e Immunobiologia dell'Harvard Medical School di Boston (USA) alla Prof.ssa Paola Salvatore del Dipartimento di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche dell'Università "Federico II" di Napoli con la quale si è collaborato a questo progetto di ricerca.

Sia il ceppo selvatico che quello mutante di *B. fragilis* sono conservati a -80°C in infuso di cuore-cervello (Oxoid) fino al momento dell'utilizzo e cresciuti anaerobicamente su terreno agar Schaedler con 5% di sangue di montone (Oxoid) a 37°C per 48h.

4.2 Ceppi murini e modalità di infezione

In questo lavoro sono stati effettuati una serie di esperimenti *in vivo* servendoci del ceppo murino C57BL/6J (Charles River Laboratory) come organismo modello immunocompetente e di topi SCID/Beige (Harlan Laboratories) come organismo modello immunocompromesso.

I topi C57BL/6J erano tutti femmina, liberi da patogeni specifici (SPF) di 8 settimane di età, mentre i topi SCID/Beige erano ugualmente tutti femmina, liberi da patogeni specifici (SPF) di 7 settimane di età. I topi sono stati alimentati con pellet di cibo da laboratorio e acqua di rubinetto "ad libitum" e sono stati stabulati in condizioni di sterilità presso il centro di Biotecnologie Avanzate CEINGE di Napoli.

Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati eseguiti secondo linee guida istituzionali. Tutti gli sforzi sono stati fatti per ridurre al minimo la sofferenza degli animali e per ridurre il numero di topi utilizzati, secondo la Direttiva del Consiglio della Comunità Europea del 24 novembre 1986 (86/609/CEE). Il protocollo dello studio è stato rivisto e approvato dal Comitato etico di cura e uso degli animali dell'Università di Napoli "Federico II", prot. 2012/0085083.

4.2.1 Infezione dei topi C57BL/6J

Un numero di 18 topi suddivisi in gruppi da 3 sono stati sottoposti a 6 differenti trattamenti secondo lo schema seguente (tab. 4.1):

Ceppo murino	Trattamento	Quantità
C57BL/6	Controllo	3
C57BL/6	<i>Bacteroides fragilis wt</i>	3
C57BL/6	<i>Bacteroides fragilis ΔPSA</i>	3
C57BL/6	<i>Bartonella henselae</i>	3
C57BL/6	<i>Bacteroides fragilis WT + Bartonella henselae</i>	3
C57BL/6	<i>Bacteroides fragilis ΔPSA + Bartonella henselae</i>	3

Tabella 4.1: Numero dei topi C57BL/6J e trattamenti a cui sono stati sottoposti.

Secondo tale schema e rispettando i trattamenti stabiliti ai topi sono stati somministrati per tre volte durante la prima settimana di stabulazione *B. fragilis WT* o *B. fragilis ΔPSA* per via orale.

A distanza di una settimana sempre rispettando le modalità di trattamento previste ai topi è stato somministrato per via intraperitoneale un inoculo di *B. henselae*.

Ai topi controllo invece è stato somministrato per via orale TSB nella quale cresce *B. henselae* per essere sicuri che le eventuali alterazioni successivamente riscontrate fossero dovute solo al batterio e non al terreno di crescita.

Al 36° giorno dalla somministrazione di *B. henselae* tutti i topi sono risultati in vita e si è proceduto prima al prelievo di sangue, raccolto in tubi con eparina, mediante puntura cardiaca e poi al sacrificio previa anestesia per il prelievo di fegato e aorta per l'analisi microscopica e molecolare.

La dose infettiva utilizzata per tutti e tre i ceppi batterici è stata di 1×10^9 CFU. Tale concentrazione e il sacrificio a 36 giorni sono stati scelti in quanto condizioni essenziali affinché nel topo si ricreassero le stesse sintomatologie riscontrate nell'uomo affetto da malattia da graffio di gatto (Regnath et al., 1998).

4.2.2 Infezione dei topi SCID

Anche i topi SCID sempre in numero di 18 suddivisi in gruppi da 3 sono stati sottoposti agli stessi 6 differenti trattamenti dei topi immunocompetenti secondo lo schema seguente (tab. 4.2):

Ceppo murino	Trattamento	Quantità
Topo SCID	Controllo	3
Topo SCID	<i>Bacteroides fragilis wt</i>	3
Topo SCID	<i>Bacteroides fragilis ΔPSA</i>	3
Topo SCID	<i>Bartonella henselae</i>	3
Topo SCID	<i>Bacteroides fragilis WT + Bartonella henselae</i>	3
Topo SCID	<i>Bacteroides fragilis ΔPSA + Bartonella henselae</i>	3

Tabella 4.2: Numero dei topi SCID e trattamenti a cui sono stati sottoposti.

Le modalità di trattamento e i cicli di infezione sono stati gli stessi effettuati per i topi immunocompetenti per cui si fa richiamo al paragrafo precedente per il procedimento completo.

Sia nel caso dei topi C57BL/6 che nel caso dei topi SCID, le infezioni batteriche e i sacrifici sono stati resi possibili grazie alla collaborazione con la dott.ssa Roberta Colicchio del Dipartimento di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche dell'Università "Federico II" di Napoli.

4.3 Microscopia ottica

4.3.1 Trattamento per l'inclusione in paraffina

Tutti i campioni (fegato e aorta) sono stati fissati in paraformaldeide 4% in PBS 0,1 M pH 7.4, overnight a 4°C e il mattino seguente sottoposti a lavaggi in tampone PBS 0,1 M pH 7.4, su ruota a 4°C per 12 ore con cambi ogni ora.

Successivamente i campioni sono stati sottoposti a disidratazione tramite immersione in etanolo a concentrazione crescente ovvero:

- 2 cambi in etanolo 50% per 5 minuti a 4°C;
- 2 cambi in etanolo 75% per 5 minuti a 4°C;
- 2 cambi in etanolo 80% per 5 minuti a 4°C;
- 4 cambi in etanolo 95% per 10 minuti a temperatura ambiente;
- 4 cambi in etanolo 100% per 10 minuti a temperatura ambiente.

Tutto ciò allo scopo di allontanare l'acqua dai campioni e consentirne la miscibilità con lo xilolo.

I campioni sono poi stati chiarificati in xilolo con 2 cambi da 10 minuti, passaggio questo che rende possibile l'inclusione in paraffina, essendo quest'ultima miscibile con lo xilolo. Lo xilolo determina la diafanizzazione dei tessuti che assumono un aspetto translucido se la disidratazione è stata effettuata correttamente.

L'inclusione dei campioni in paraffina avviene in maniera graduale. I campioni sono stati sottoposti a un primo passaggio in xilolo/paraffina in rapporto 2:1 in stufa a 60°C per 20 minuti e successivamente a un secondo passaggio in xilolo/paraffina 1:1 sempre in stufa a 60°C per altri 20 minuti in modo da consentire alla paraffina di penetrare nel tessuto. In seguito i campioni sono stati immersi sempre in stufa a 60°C in paraffina pura overnight e sottovuoto. Nella stufa è stato creato il vuoto sottoponendo i campioni a una pressione di 600 mbar per garantire una migliore penetrazione della paraffina.

La mattina seguente i campioni sono stati immersi in nuova paraffina per due ore e sempre sottovuoto in stufa a 60°C..

Al termine delle due ore i campioni sono stati inclusi in paraffina utilizzando gli stampini per le inclusioni e orientandoli opportunamente per facilitarne il taglio. Gli stampini sono stati poi fatti raffreddare in modo da far solidificare la paraffina e ottenere i blocchetti che sono stati poi tagliati al microtomo. I blocchetti sono stati lasciati solidificare a temperatura ambiente.

Reagenti utilizzati:

- Paraformaldeide (PFA) 4% in PBS 0,1M:

- a 60-70°C far sciogliere 2 g di paraformaldeide in 25 ml di H₂O bidistillata;
- aggiungere 3-6 gocce di NaOH (0,4 g di NaOH in 10 ml di H₂O bidistillata);
- portare la soluzione a 18°C, filtrare e porre in frigo;
- si arriva a soluzione finale di 50 ml aggiungendo PBS 0,2M (2x).

- Tampone PBS 0,2M pH 7.4:

- 700 ml di H₂O bidistillata;
- 16 g di NaCl;
- 0,4 g di KCl;
- 2,88 g di Na₂HPO₄;
- 0,48 g di KH₂PO₄.

Si aggiusta il pH a 7,4 con HCl e successivamente si aggiunge H₂O bidistillata fino a raggiungere il volume finale di un litro.

4.3.2 Taglio

Per ottenere le sezioni dai campioni, i blocchetti di paraffina sono stati montati sull'apposito supporto per microtomo. I blocchetti sono stati modellati rimuovendo la paraffina in eccesso con una lametta e creando una piramide intorno al campione per poter ottenere il nastro di sezioni. Le sezioni sono state tagliate con uno spessore di 5 µm con microtomo rotativo Reichert in dotazione nel nostro laboratorio.

I vetrini sono stati pre-trattati con poli-L-lisina per consentire una migliore adesione delle sezioni. Per tale scopo i vetrini sono stati lavati con alcol acido costituito da 50 ml di etanolo

e 0,5 ml di HCl al 37% per essere puliti adeguatamente. La poli-lisina (Sigma-Aldrich), invece è stata diluita 1:10 in H₂O MQ a temperatura ambiente. I vetrini sono stati immersi nella soluzione di poli-L-lisina per 5 minuti e poi asciugati per 24 ore.

I nastri di sezioni ottenuti dal taglio dei campioni devono essere ben distesi prima di essere posti sul vetrino, per questo si utilizza un bagnetto termostato contenente acqua distillata. Una volta che le sezioni con il calore si sono distese, il nastro viene posizionato sul vetrino e quest'ultimo, infine, estratto dall'acqua e fatto asciugare per permettere la completa adesione delle sezioni.

4.3.3 Colorazione emallume/eosina

Sulle sezioni ottenute al microtomo di ciascun campione è stata eseguita la colorazione emallume-eosina. A tal fine le sezioni sono state deparaffinate tramite due passaggi in xilolo, ciascuno di 10 minuti a temperatura ambiente e idratate tramite passaggi di 5 minuti ciascuno in etanolo a concentrazioni decrescenti (etanolo 100%, etanolo 95%, etanolo 80% ed etanolo 70%). L'idratazione termina con un passaggio di 3 minuti in acqua distillata.

In seguito i vetrini con le sezioni sono stati immersi in emallume-acido di Mayer che colora di blu-violetto i nuclei, per cinque minuti, lavati velocemente in acqua distillata e contrastati per 20 minuti in acqua di fonte per permettere il viraggio del colorante in ambiente leggermente alcalino.

I vetrini sono poi stati immersi in eosina in cui sono state aggiunte poche gocce di acido acetico, che funge da mordensante, per 30 secondi e poi lavati velocemente in acqua distillata.

I vetrini sono stati infine montati con DPX previa disidratazione con passaggi rapidi in etanolo a concentrazioni crescenti: 50%, 70%, 80%, 95%, 100% e xilolo.

L'ematossilina evidenzia in blu/violetto tutte le componenti basofile come le membrane cellulari, le proteine di membrana, il DNA e l'RNA. L'eosina, invece, evidenzia in rosso o rosa tutte le componenti acidofile.

Reagenti utilizzati:

- Emallume acido di Mayer:

- 1g ematossilina;
- 50 g allume di potassio;

- 0,20 g iodato di sodio;
- 50g cloralio idrato;
- 1g acido citrico.

Si sciolgono a caldo in 500 mL di H₂O distillata ematossilina e allume di potassio. Quando la soluzione si è raffreddata si aggiungono iodato di sodio sciolto in 50 mL di H₂O distillata e, cloralio idrato e acido citrico sciolti insieme in 450 mL di H₂O distillata. Dopo 1 ora circa si filtra con carta.

- Eosina 1% in soluzione acquosa:

- 1 g di eosina giallastra;
- 100 mL di H₂O distillata;
- 2-3 gocce di acido acetico.

Si scioglie l'eosina in 100 mL di H₂O distillata. Si lascia amalgamare il tutto e si filtra. Al momento dell'utilizzo si aggiungono 2-3 gocce di acido acetico che serve da mordensante, ovvero permette al colorante di legarsi più facilmente. La soluzione è conservata al buio e filtrata sempre prima dell'utilizzo.

4.3.4 Acquisizione delle immagini

Le immagini di microscopia ottica sono state acquisite tramite videocamera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) montata sul microscopio Zeiss-Axioskope e elaborate con l'ausilio del software Axiovision 4.7 (Carl Zeiss) in dotazione presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

4.4 Microscopia elettronica a trasmissione

4.4.1 Trattamento per l'inclusione in resina

Tutti i campioni (fegato e aorta) sia prelevati dai topi immunocompetenti che da quelli immunocompromessi, sono stati fissati in glutaraldeide 1,5% in tampone cacodilato 0,067 M a pH 7.4 per 3 ore a 4°C. La fissazione è stata seguita da un lavaggio veloce e da 4 lavaggi da 30' con tampone cacodilato 0,134 M pH 7.4 a 4°C. Al termine dei lavaggi i campioni sono stati post-fissati in tetrossido di osmio 1% in tampone cacodilato 0,134 M pH 7.4 a 4°C.

I campioni sono poi stati sottoposti a disidratazione mediante immersione in etanolo a concentrazione crescente così come segue:

- 2 cambi da 5 minuti in etanolo 25% a 4°C;
- 2 cambi da 10 minuti in etanolo 50% a 4°C;
- 2 cambi da 10 minuti in etanolo 70% a 4°C;
- 4 cambi da 15 minuti in etanolo 95% a temperatura ambiente;
- 4 cambi da 15 minuti in etanolo 100% a temperatura ambiente.

L'uso dell'etanolo come agente disidratante implica, prima dell'inclusione in resina, l'impiego di un solvente di transizione, in particolare con gli epossidi, che non sono solubili in etanolo. Il solvente di transizione utilizzato è stato l'ossido di propilene, mentre la resina utilizzata è stata la resina epossidica preparata con EPON 812.

Gli step eseguiti sono stati:

- 2 cambi da 10 minuti in ossido di propilene;
- 1 ora in ossido di propilene e resina in rapporto 2:1;
- overnight in ossido di propilene e resina in rapporto 1:1;
- 2 cambi da 2 ore in resina epossidica.

I campioni, infine, una volta inseriti negli appositi stampini orientati in base alle esigenze sperimentali e ricoperti di resina epossidica, sono stati riposti in stufa a 60°C per 3 giorni in modo da consentire che la polimerizzazione della resina.

Reagenti utilizzati:

- Buffer Cacodilato 0,2 mol/L pH 7.4:

- Sodio Cacodilato 32,78 g
- H₂O Milli-Q 964 mL
- HCl 6 mL

- Buffer Cacodilato 0,134 mol/L pH 7.4:

- Buffer Cacodilato 0,2 mol/L 670 mL
- H₂O Milli-Q 330 mL

- Glutaraldeide 1,5% in Buffer Cacodilato 0,067 mol/L:

- Buffer Cacodilato 0,134 mol/L 50 mL
- Glutaraldeide 25% 6 mL

- Saccarosio 1 g
- H₂O Milli-Q fino al volume di 100 mL

- Tetrossido di Osmio 1% in Buffer Cacodilato 0,134 mol/L:

- Tetrossido di Osmio 4% 2 mL
- H₂O Milli-Q 2 mL
- Buffer Cacodilato 4 mL

- Resina epossidica:

- Epon 812 19,20 g
- DDSA 7,60 g
- MNA 13,2 g

Agitare finché non si ottiene una miscela omogenea e successivamente aggiungere:

- DMP30 0,64 g

Agitare fino a quando la resina si presenta uniforme senza le bande caratteristiche della stratificazione dei reagenti.

4.4.2 Sezionamento

Per poter esaminare con adeguata risoluzione al microscopio elettronico a trasmissione un campione, occorre che esso possieda quelle caratteristiche di limitato spessore che vengono inderogabilmente imposte dai principi di funzionamento dello strumento. A tal fine il materiale biologico è stato sezionato mediante ultramicrotomo. Per tale operazione è stato utilizzato l'ultramicrotomo "REICHERT-JUNG SUPERNOVA" in dotazione presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Prima di procedere all'allestimento delle sezioni ultrafini, si ricavano dal blocchetto di inclusione alcune sezioni di maggiore spessore (1,5 µm) utilizzate per l'osservazione al microscopio ottico. Tali sezioni fini, servono principalmente per poter verificare la qualità dell'inclusione, sia riguardo al procedimento di fissazione eseguito sul materiale biologico che per quanto si riferisce al polimero ottenuto. La sezione fine serve inoltre per individuare la zona del preparato di maggiore interesse, che viene delimitata con una operazione di trimming e dalla quale vengono ricavate le sezioni ultrafini dello spessore di 40-80 nm. A tal fine le sezioni fini ottenute sono state colorate con blu di toluidina all'1%.

Le sezioni ultrafini sono state ottenute con l'ausilio di una lama di diamante (Diatome ultra 45°) e raccolte su grid di rame da 250 mesh.

Reagenti utilizzati:

- Blu di toluidina:

- Blu di toluidina 1 g
- Sodio borato 2 g
- H₂O Milli-Q 100 ml

Sciogliere il sodio borato a caldo in acqua milli-Q, aggiungere sempre a caldo il blu di toluidina e lasciare decantare. Dopo 24 ore filtrare in un contenitore di vetro scuro.

4.4.3 Contrasto

Per poter esaminare le sezioni ultrafini con sufficiente contrasto, occorre incrementare artificialmente il ridotto coefficiente di scattering posseduto dalle strutture biologiche incluse. A tale fine i campioni sono stati sottoposti, ad una fase di "colorazione" con soluzioni contenenti elementi ad elevato numero atomico, ovvero acetato di uranile 3% in EtOH 50% e citrato di piombo 2,66%.

Per contrastare le sezioni sono state messe per ogni grid delle gocce di acetato di uranile su del parafilm disteso all'interno di una capsula di Petri, coperta con carta argentata per evitare la formazione di precipitati indotti dalla luce. Le griglie sono state tenute immerse per 10 minuti e successivamente sciacquate, tramite numerosi passaggi in 3 becher contenenti acqua milli-Q sterile.

Una volta asciugati le griglie sono state adagiate su gocce di citrato di piombo su del parafilm disteso all'interno di un'altra capsula di Petri, sui cui bordi è stato inserito idrossido di sodio essenziale per il sequestro dell'anidride carbonica, impedendo che il citrato di piombo precipiti sottoforma di carbonato di piombo. Dopo 3 minuti sono state ripetute le stesse fasi di sciacquo e asciugatura attuate per l'acetato di uranile.

Reagenti utilizzati:

- Acetato di uranile:

- Etanolo 50% 100 mL
- Acetato di uranile 3 g

Versare l'acetato di uranile in un becher contenente 100 mL di etanolo 50% e agitare per 1 ora. Il prodotto ottenuto va conservato in camera fredda al buio e centrifugato prima dell'uso.

- Citrato di piombo:

- Citrato di piombo 1,33 g
- H₂O milli-Q 50 mL
- Idrossido di sodio 1% 8 mL

Sciogliere il citrato di piombo in 30 mL di acqua milli-Q tramite ausilio di agitatore magnetico. Aggiungere 8 mL di idrossido di sodio 1% goccia a goccia fino a che la soluzione non appare trasparente e portare a volume di 50 mL con acqua milli-Q.

4.4.4 Acquisizione delle immagini

Le immagini di microscopia ottica delle sezioni fini colorate con blu di toluidina sono state acquisite tramite videocamera AxioCam MRC5 (Carl Zeiss) montata sul microscopio Zeiss-Axioskope e elaborate con l'ausilio del software Axiovision 4.7 (Carl Zeiss) in dotazione presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Le immagini di microscopia elettronica delle sezioni ultrafini dei campioni dei topi immunocompetenti sono state ottenute al TEM JEM-1011 (JEOL), 100 KV, in dotazione presso la Facility of Integrated Microscopy dell'Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati Traverso" del CNR di Napoli diretta dalla dott.ssa R. Tatè.

Le immagini di microscopia elettronica delle sezioni ultrafini dei campioni dei topi immunocompromessi sono state ottenute al TEM Philips EM 208S, (HT range 20-120 kV), in dotazione presso il Centro di Servizi Metrologici Avanzati Ce.S.M.A. di Napoli.

4.5 Nested PCR

Per determinare la presenza di DNA batterico nel tessuto di topo, è stata sviluppata una nested-PCR per amplificare un frammento del gene *gltA* di *B. henselae* (esterno: 674 bp; interno: 353 bp). Tale saggio è stato effettuato presso il Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" grazie alla collaborazione con il Prof. Francesco Paolo D'Armiento.

4.5.1 Estrazione del DNA

Fette di tessuto di fegato infetto (spessore 20 μm), da organi inclusi in paraffina, sono state fornite dalla Facility di Patologia Comparata del CEINGE-Biotecnologie Avanzate di Napoli. Il DNA è stato isolato utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania) secondo il protocollo del produttore.

Sono state inserite 8 sezioni in una provetta da 2,0 ml per ogni campione utilizzando i guanti. Le provette sono state centrifugate per 15 secondi a 13200 rpm. Successivamente a queste sono stati aggiunti 800 μl di xilolo e sono state vortexate per 15 secondi alla massima velocità e centrifugate per 5 minuti a 13000 rpm.

Una volta eliminato il surnatante, sono stati aggiunti 500 μl di etanolo assoluto e le provette sono state ulteriormente vortexate alla massima velocità per 15 secondi e centrifugate per 5 minuti a 13000 rpm. Il surnatante è stato eliminato di nuovo ed è stata ripetuta l'aggiunta di etanolo e la procedura conseguente.

Al termine di questa fase le provette con il tappo aperto sono state inserite nel Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germania) impostato a 300 rpm e a 45°C per circa 5-10 minuti, a seconda della dimensione del pellet. Una volta evaporato tutto l'etanolo, sono stati aggiunti 180 μl di buffer ATL e 20 μl di proteinasi K. Le provette sono state vortexate con il tappo sigillato da parafilm per evitare che si potesse aprire e sono state incubate a 56°C per tutta la notte in un incubatore su una ruota in movimento.

Il giorno successivo i campioni sono stati centrifugati per 15 secondi a 13200 rpm per eliminare i residui dalle pareti e ad essi sono stati aggiunti 200 μl di buffer AL. Le provette sono state vortexate per 15 secondi alla massima velocità e incubate in un termoblocco (CH-100 BioLabo, Châtel-St.Denis) per 10 minuti a 70°C e al termine centrifugate per 15 secondi a 13200 rpm. Ai campioni sono stati aggiunti 200 μl di etanolo e le provette sono state vortexate a massima velocità per 15 secondi e centrifugate per 15 secondi a 13200 rpm.

La miscela ottenuta da ogni campione (600 μl circa) è stata pipettata in una colonna QIAamp e centrifugata a 8000 rpm per 1 minuto. Da queste è stata staccata la provetta di raccolta e gettato l'eluato, mantenendo la colonna con il filtro e mettendola su una provetta di raccolta pulita a cui sono stati aggiunti 500 μl di buffer AW1. Le provette sono state centrifugate a 8000 rpm per 1 minuto, dopodiché da queste è stata staccata la provetta di raccolta e

gettato l'eluato, mantenendo la colonna con il filtro e inserita su una nuova provetta di raccolta pulita.

A queste sono stati aggiunti 500 µl di buffer AW2 e ugualmente le provette sono state centrifugate a 13200 rpm per 3 minuti, al termine del quale da queste sono state staccate le provette di raccolta e gettato l'eluato, mantenendo la colonna con il filtro inserita nuovamente su una provetta di raccolta pulita, ulteriormente centrifugata a 13200 rpm per 1 minuto.

Le colonne con il filtro sono state poi appoggiate su provette da 1,5 ml nelle quali sono state aggiunte 50 µl di buffer AE sul filtro, incubate a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugate a 8000 rpm per 1 minuto. Gli eluati ottenuti dal passaggio precedente sono state pipettate e ricaricate sulle stesse colonne QIAamp, incubate 5 minuti a temperatura ambiente e centrifugate a 8000 rpm per 1 minuto. Le colonne con filtro, infine, sono state gettate e mantenute solo le provette contenenti le soluzioni di DNA.

Per verificare se il DNA ottenuto fosse di buona qualità, è stata utilizzata la misurazione allo spettrofotometro Nanodrop. Come campione bianco e quindi per azzerare la lettura, sono stati utilizzati 2 µl di buffer AE. Gli acidi nucleici presenti nella soluzione sono stati quantizzati utilizzando 2 µl del DNA estratto.

Lo strumento ci ha fornito contemporaneamente letture a 230, 260, 280 e 320 nm. La concentrazione di acidi nucleici e in particolare i rapporti 260/280 e 260/230, sono risultati entrambi essere compresi nel range ottimale tra 1,6 e 2,0. Il DNA assorbe a una lunghezza d'onda di 260 nm, le proteine a 280 nm mentre lo xilolo e l'etanolo a 230 nm. Valori elevati a 230 o 280 avrebbero denotato pertanto rispettivamente contaminazione di xilolo/etanolo o proteine.

4.5.2 Amplificazione mediante PCR

La PCR è stata eseguita con la polimerasi AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) in un volume di 50 µl in due provette sequenziali. Le due mix di reazione erano ugualmente composte da: 5µl di PCR Buffer 10X, 6 µl di MgCl₂ 25 mM, 1 µl di dNTPs 10 mM, 0,2 µl di dUTP 10 mM, 2,50 µl di entrambi i primers 10 µM, 0,8 µl di Taq polimerasi 5U/µl, 28 µL di acqua sterile e 4 µL di DNA diluito a 25 ng/µL sempre in acqua sterile.

Gli ampliconi attesi sono stati rilevati utilizzando due coppie di primer: OuterBh R/L (674 bp), InnerBh R/L (353 bp); OuterBf R/L (599 bp), InnerBf R/L (353 bp). Le sequenze dei primer utilizzati sono le seguenti:

Primer	Sequenza
Outer Bh R	5'GGT CCC AAC TCT TGC CGC TAT G 3'
Outer Bh F	5'CAG CCG ACA CTG CGT GCT AAT G 3'
Inner Bh R	5'ATG CCT AAA AAT GTT ACA AGA 3'
Inner Bh F	5'CGT GCT AAT GCA AAA AGA AC 3'

Tabella 4.3: Primer utilizzati per amplificare il gene gltA.

L'amplificazione del segmento genico è avvenuta secondo il seguente programma: denaturazione iniziale di 4' a 95°C, amplificazione dei primer esterni eseguita con 30 cicli di 1' a 94°C, 1' a 70°C e 2' a 72°C. Amplificazione dei primers interni consisteva di 30 cicli di 1' a 94°C, 10' a 30°C e 1' a 72°C. La fase finale di estensione è stato estesa a 10' in entrambi le PCR. Vari controlli negativi sono stati inclusi per escludere la contaminazione incrociata.

Gli ampliconi previsti sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio 1,8% in tampone TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X a cui è stato aggiunto bromuro di etidio a una concentrazione finale di 1µg/ml. Le bande sono state osservate con il transilluminatore e l'immagine è stata acquisita mediante software Image Master.

A causa dell'esiguo numero di cellule batteriche nei campioni analizzati, gli ampliconi esterni non sono stati rilevati mediante elettroforesi. La PCR è stata ripetuta due volte da due campioni di DNA di fegati diversi per ogni trattamento considerato.

4.6 Numero di EPC nei topi infetti

Per valutare il numero di EPC dai topi sia immunocompetenti che immunocompromessi, in seguito ad anestesia con tribromoetano (Avertin) 240 mg/Kg somministrato per via intraperitoneale, è stata prelevata una singola aliquota di sangue da ogni singolo topo

mediante puntura cardiaca dal ventricolo sinistro, utilizzando aghi di dimensioni adeguate, al 36° giorno dall'infezione con *B. henselae*, quindi pochi istanti prima del sacrificio.

Il sangue è stato raccolto in tubi rivestiti da eparina e un volume di 100 µl di sangue è stato incubato per 30' al buio con anticorpo monoclonale di topo diretto contro la proteina ancorata al fosfatidilinositolo 1 (Ly-6A/E) (Sca-1) coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC)(BD Pharmingen) e anticorpo di topo diretto contro la chinasi epatica fetale 1 (FLK-1) coniugato con ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen). Anticorpi di isotipo IgG (BD Pharmingen) sono stati utilizzati come controlli.

Dopo l'incubazione, gli eritrociti sono stati lisati utilizzando 2 ml di soluzione di lisi 1x (Becton-Dickinson) per il FACS per ogni provetta. In seguito i campioni sono stati lavati con PBS ed analizzati su FACScan (Becton-Dickinson) usando il software CellQuest. Ogni analisi ha incluso circa 10000 eventi, riferiti al numero totale di cellule bianche.

I dati quantitativi sono raffigurati come media \pm deviazione standard (SD) ottenuti da almeno tre campioni di sangue per trattamento. La significatività è stata valutata tramite test ANOVA seguito da un post hoc t-test adatto.

4.7 Isolamento e infezione delle EPC *in vitro*

EPC umane sono state isolate da cellule mononucleate del sangue periferico totale (PBMCs). Il consenso informato scritto al trattamento di tali cellule è stato ottenuto da donatori secondo la dichiarazione di Helsinki. I prelievi di sangue sono stati effettuati presso il "Centro di Immunologia Clinica ed Immunoematologia, Medicina Trasfusionale ed Immunologia dei Trapianti" del Primo Policlinico della Seconda Università degli Studi di Napoli diretto dal prof. Claudio Napoli.

4.7.1 Isolamento e coltura delle cellule

Il sangue è stato raccolto in tubi eparinati da 15 ml. In una provetta conica da centrifuga da 50 ml sono stati aggiunti 15 ml di Histopaque®- 1077 (Sigma-Aldrich). Histopaque 1077 è una soluzione a base di polisaccarosio e diatrizoato di sodio corretti ad una densità di 1,077 \pm 0,001 g/ml, ed è un mezzo che assicura il recupero rapido di cellule mononucleari vitali da volumi ridotti di sangue.

A temperatura ambiente sono stati versati 30 ml di sangue intero sulla soluzione di Histopaque 1077 e questa è stata centrifugata a 400 x g per 30 minuti in centrifuga senza freno né acceleratore.

Dopo la centrifuga con una pipetta Pasteur è stato aspirato con cautela ed eliminato lo strato superiore fino a 0,5 cm dall'interfaccia opaca contenente le cellule mononucleari. Lo strato opaco è stato poi trasferito con una pipetta Pasteur in una provetta conica per centrifuga pulita da 50 ml. Qui sono stati aggiunti 30 ml di tampone PBS 0,1M pH 7.4 e il tutto è stato centrifugato a 250 x g per 10 minuti a temperatura ambiente. Il supernatante è stato aspirato e gettato e il pellet cellulare risospeso in 15 ml di PBS 0,1M pH 7.4 e centrifugato a 250 x g per 10 minuti a temperatura ambiente.

Il pellet è stato diluito in terreno di coltura EGM2 (Lonza) 1:100. E' stata effettuata la conta cellulare su camera di Burkner, i tre quadrati considerati presentavano 47, 54 e 44 cellule per cui la media è stata di 48 per 10^4 cellule che moltiplicato per 100 che era il fattore di diluizione ha dato come risultato 48 milioni di cellule/microlitro.

A questo punto in ogni pozzetto delle multiwell (Corning®) è stato posto 1 mL di cellule diluite in EGM2 e 2 ml di EGM2 e le piastre di coltura sono state incubate in incubatore a 37° in 5% di CO2 mantenendo l'ambiente umidificato. Le colture cellulari sono state effettuate su piastre multiwell da 6 pozzetti dal diametro di 3,5 cm; tali piastre sono state pretrattate con gelatina e fibronectina allo 0,2% per 1 ora in incubatore a 37°C per favorirne l'adesività alle cellule.

4.7.2 Infezione *in vitro*

Per gli esperimenti di infezione *in vitro* soluzioni madri di *B. henselae*, *B. fragilis* WT e *B. fragilis* Δ PSA sono state scongelate, lavate e sospese in coltura cellulare libera da antibiotico. Le EPC coltivate sono state infettate con *B. henselae* alla molteplicità di infezione (MOI) di 100. *B. fragilis* WT o *B. fragilis* Δ PSA sono stati usati a MOI di 100, 200 e 400 per stabilire le concentrazioni ottimali *in vitro*. A 24, 48 e 72 ore di incubazione le EPC sono state infettate con *B. fragilis* WT o *B. fragilis* Δ PSA e/o *B. henselae*. Le co-infezioni con *B. henselae* sono state effettuate sia contemporaneamente che dopo 3 ore dall'infezione con *B. fragilis* WT o con *B. fragilis* Δ PSA. Le colture sono state bloccate al momento stabilito e le EPC sono state lavate per tre volte con tampone fosfato (PBS) per rimuovere i batteri non aderenti. Per la

rimozione selettiva di batteri extracellulari, sono stati aggiunti 100 mg/ml di gentamicina (Schering-Plough). Per determinare le CFU, le cellule sono state lavate per 2h con PBS dopo aggiunta di gentamicina, lisate mediante aggiunta di acqua distillata ghiacciata, ed incubate per 5' sul ghiaccio. Il MOI utilizzato per ogni esperimento è stata confermata da diluizioni seriali su piastra.

4.7.3 Microscopia confocale a scansione laser

Le cellule in coltura sono state fissate con paraformaldeide al 3% per 20' a temperatura ambiente e permeabilizzate con 0,1% Triton-X100. Le cellule sono state poi incubate 60' a temperatura ambiente con anticorpi specifici. L'anticorpo primario monoclonale anti-*B. henselae* (Novus Biologicals), è stato diluito 1/100 e rivelato con anticorpo secondario coniugato a Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA) per 30' a temperatura ambiente. L'anticorpo primario monoclonale anti-lipolisaccaride di *B. fragilis* (LPS) (Santa Cruz Biotechnology, INC) è stato diluito 1/250 e rivelato con anticorpo secondario coniugato con isotiocianato tetrametilrodamina (TRITC, Dako), diluito 1/20. Le immagini sono state acquisite al microscopio confocale Carl-Zeiss LSM 510. Le emissioni di fluorescenza sono state acquisite in modalità multi-traccia con filtro LP505. Per minimizzare il rumore, ciascuna immagine è stata scattata in media tre volte.

4.7.4 Microscopia elettronica a trasmissione

Le EPC in coltura sono state infettate con MOI 100 di *B. henselae*, *B. fragilis* WT o *B. fragilis* Δ PSA o co-infettate con *B. fragilis* WT e *B. henselae* o con *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*. A tal fine i batteri sono stati prima lavati per 2 volte in terreno di coltura EGM2 privo di antibiotico e poi centrifugati a 4000 x g a 4°C. Dai pozzetti delle multiwell con le cellule in coltura è stato prelevato terreno di coltura pari allo stesso volume di soluzione batterica successivamente aggiunto in base al trattamento. Sono state utilizzate multiwell (Corning®) da 24 pozzetti e ad ogni trattamento sono state sottoposte le cellule di tre differenti pozzetti.

Le piastre sono state incubate per 48 ore a 37°C e con 5% di CO₂. Dopo 48 ore le piastre sono state sottoposte a lavaggio con PBS 0,1M pH 7.4. Ogni pozzetto è stato trattato con tripsina/EDTA (300 μ L/1500 μ L) in modo da staccare le cellule dal fondo e poterle trasferire

in tubetti da 2 ml. I tubetti sono stati poi centrifugati a 2000 rpm per 10 minuti, sottoposti a un lavaggio in PBS 0,1M pH 7.4 e ulteriormente centrifugati a 2000 rpm per 10 minuti.

Le cellule sono state fissate in glutaraldeide 4% (Fluka) in PBS 0,05M pH 7.4 a 4°C per 2 ore. La fissazione è stata seguita da un lavaggio veloce e da 4 lavaggi da 30' con tampone PBS 0,1 M pH 7.4 a 4°C. Al termine dei lavaggi i campioni sono stati post-fissati in tetrossido di osmio 1% (Sigma-Aldrich) in tampone PBS 0,1 M pH 7.4 a 4°C.

I campioni sono poi stati sottoposti a disidratazione mediante immersione in etanolo a concentrazione crescente così come segue:

- 2 cambi da 5 minuti in etanolo 25% a 4°C;
- 2 cambi da 10 minuti in etanolo 50% a 4°C;
- 2 cambi da 10 minuti in etanolo 70% a 4°C;
- 4 cambi da 15 minuti in etanolo 95% a temperatura ambiente;
- 4 cambi da 15 minuti in etanolo 100% a temperatura ambiente.

Tutti i passaggi sono seguiti da centrifuga dei campioni a 2000 rpm a cui è stato poi eliminato il surnatante. Alla disidratazione in etanolo sono seguiti:

- 2 cambi da 10 minuti in ossido di propilene;
- 1 ora in ossido di propilene e resina in rapporto 2:1;
- overnight in ossido di propilene e resina in rapporto 1:1;
- 2 cambi da 2 ore in resina epossidica.

I campioni, infine, una volta inseriti negli appositi stampini orientati in base alle esigenze sperimentali e ricoperti di resina epossidica, sono stati riposti in stufa a 60°C per 3 giorni in modo da consentire che la polimerizzazione della resina.

I blocchetti sono stati sezionati all'ultramicrotomo "REICHERT-JUNG SUPERNOVA" in dotazione presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II". Le sezioni fini ottenute dello spessore di 1,5 µm sono state colorate con blu di toluidina all'1%. Le sezioni ultrafini dello spessore di 50 nm, invece, ottenute con l'ausilio di una lama di diamante (Diatome ultra 45°), sono state raccolte su grid di rame da 250 e 300 mesh e contrastate con acetato di uranile al 3% in etanolo 50% e citrato di piombo al 2,66% in soluzione acquosa.

Le micrografie sono state acquisite al TEM Philips EM 208S (HT range 20-120 kV), in dotazione presso il Centro di Servizi Metrologici Avanzati Ce.S.M.A. di Napoli.

4.8 Isolamento dell'RNA e saggio quantitativo Real Time PCR

L'RNA totale è stato isolato *in vitro* da colture di EPC non infette, infettate con *B. henselae*, *B. fragilis* WT, *B. fragilis* Δ PSA o co-infettate con *B. fragilis* WT e *B. henselae* o con *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*, utilizzando TRIZOL (Invitrogen) secondo il protocollo standard suggerito dal produttore. L'integrità e la concentrazione dell'RNA sono stati valutati mediante elettroforesi su gel d'agarosio e Nanodrop. La qualità dell'RNA di ciascun campione era buona, con rapporto 260/280 compreso tra 1,8 e 2,0.

Tutti gli RNA purificati sono stati poi convertiti in cDNA usando il Kit RT² First Strand (SABiosciences, Frederick, USA) seguendo il protocollo del produttore. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per le analisi quantitative con Real-Time PCR eseguita mediante uno specifico RT² ProfilerTM Array PCR (SABiosciences). L'esperimento è stato eseguito all'istituto di genetica e biofisica "A. Buzzati-Traverso" del CNR di Napoli presso il laboratorio del prof. Alfredo Ciccodicola.

In particolare, i campioni sono stati analizzati su piastra a 96 pozzetti RT² Profiler PCR Array (IPA-011) per valutare l'espressione dei principali geni che codificano per le citochine infiammatorie umane e i loro recettori. Tali array offrono un mix tra la capacità dei microarray di analizzare l'espressione genica su larga scala e la sensibilità quantitativa di una Real-Time PCR, con elevata riproducibilità dei risultati.

Un totale di 89 geni (tra cui 5 geni house-keeping) sono stati analizzati in questo PCR-array per ogni campione. I cDNA sono stati aggiunti indipendentemente alla RT² SYBR Green qPCR Master Mix (SABiosciences, Frederick, USA) e poi spottati su 6 PCR-array per citochine infiammatorie umane e loro rispettivi recettori. Tutta la procedura sperimentale è stata eseguita secondo le istruzioni del produttore per il sistema 7900HT Real Time PCR (Applied Biosystems). Le curve di fusione sono state generate dopo 40 cicli di amplificazione.

L'espressione genica relativa è stata misurata utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. I valori del ciclo di soglia (Ct) sono stati convertiti a 2^{-Ct} per essere proporzionali alla quantità di trascritti nei campioni. I valori di $Ct \geq 35$ cicli sono stati considerati non rilevabili. Per confrontare i campioni tra loro, i valori $2^{-\Delta Ct}$ sono stati normalizzati rispetto ai valori di espressione media dei geni housekeeping (come specificato per i PCR-Array). Per confrontare i dati di espressione dei geni derivati da diverse condizioni sperimentali, sono stati calcolati i valori $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$\Delta\Delta Ct$, ottenuti normalizzando i dati sperimentali ai dati di riferimento (EPC non infette). I dati derivati da tale analisi sono stati anche controllati tramite elaborazione su foglio Excel scaricato dal sito web del produttore (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>). Per ogni reazione di PCR, il foglio Excel consente la normalizzazione dei dati correggendo tutti i valori Ct rispetto ai valori Ct medi dei geni housekeeping presenti sull'array. Nei nostri esperimenti abbiamo osservato che tra i geni housekeeping standard l'ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HPRT) è risultata molto variabile tra campioni, quindi non è stata considerata per le normalizzazioni dei dati. Geni differenzialmente espressi sono stati definiti come quelli con variazione di espressione di almeno 2 volte. I risultati sono presentati in istogramma come media di 3 valori significativi \pm errore standard. Test t di Student è stato utilizzato per il confronto delle medie.

4.9 Misura delle citochine dal surnatante delle colture cellulari

I surnatanti dei pozzetti delle multiwell in cui sono state coltivate le EPC per la microscopia elettronica a trasmissione a 48 ore di infezione sono stati prelevati e testati per valutare i livelli di citochine e chemochine secrete mediante kit ELISA commerciale seguendo le indicazioni del produttore (SABiosciences, Qiagen Company). L'esperimento è stato condotto presso il Dipartimento di Patologia Generale della Seconda Università degli Studi di Napoli, grazie alla collaborazione con la prof.ssa Linda Sommese e la dott.ssa Amelia Casamassimi. Le concentrazioni delle citochine (pg/ml) IL1A, IL 1B, L2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL17A, IFNC, TNFa e GM-CSF sono state misurate con un lettore ELISA (Tecan). I risultati sono presentati in istogramma come media di 6 valori significativi \pm errore standard. Test t di Student è stato utilizzato per il confronto delle medie e l'analisi di regressione è stata utilizzata per valutare eventuali correlazioni fra i diversi livelli di citochine. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

CAPITOLO 5

Risultati: parte I

5.1 Effetti del PSA in *Mus musculus*

5.1.1 Nested PCR

L'amplificazione di una porzione di 353 bp del gene *gltA* codificante per la citrato sintasi in *Bartonella henselae* ha permesso di rilevare la presenza di DNA del batterio da sezioni di fegato incluse in paraffina dei vari campioni analizzati in questo lavoro.

Come si evince dalla figura 5.1, il DNA di *B. henselae* è stato rilevato a 36 giorni dall'infezione nei campioni infettati da sola *B. henselae* (lanes 3-4) e nei campioni co-infettati rispettivamente da *B. fragilis* WT e *B. henselae* (lanes 5-6) e da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* (lanes 7-8). Il DNA di *B. henselae* non è stato invece rilevato nei campioni infettati da solo *B. fragilis* WT (lane 1) e *B. fragilis* Δ PSA (lane 2) considerati controlli negativi, mentre come controllo positivo si è utilizzato DNA genomico estratto da *B. henselae* (lane 9).

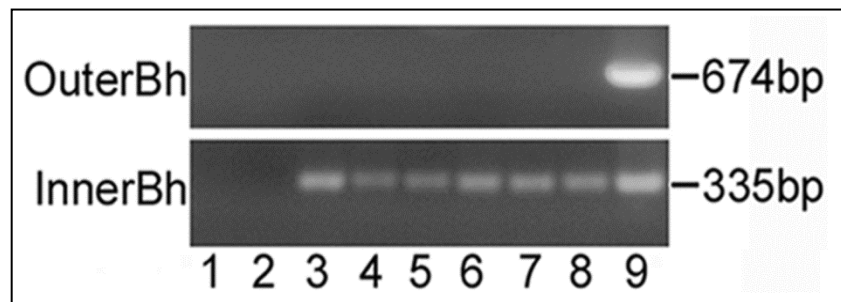


Figura 5.1: Individuazione del gene *gltA* di *B. henselae* mediante nested-PCR dai campioni di fegato di topi C57BL/6J infettati sperimentalmente con *B. fragilis* WT (lane 1), *B. fragilis* Δ PSA (lane 2), *B. henselae* (lanes 3-4), co-infettati con *B. fragilis* WT e *B. henselae* (lanes 5-6), co-infettati con *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* (lanes 7-8). Il DNA genomico estratto da *B. henselae* è stato utilizzato come controllo positivo (lane 9).

5.1.2 Analisi morfologica

Le analisi morfologiche eseguite mediante colorazione con emallume-eosina hanno evidenziato nel fegato di topi infettati da *B. henselae* una reazione infiammatoria di tipo granulomatosa, caratterizzata da aggregati istiocitari e infiltrati linfoidi, localizzata

prevalentemente nella regione perivascolare sia a livello delle vene centrolobulari che a livello delle triadi portali (fig. 5.2D). Tali infiltrati granulomatosi risultano essere meno invasivi nei gruppi co-infettati da *B. henselae* e *B. fragilis* Δ PSA (fig. 5.2F) e quasi assenti nei gruppi di topi co-infettati da *B. henselae* e *B. fragilis* WT (fig. 5.2E). Non si è osservata infiammazione nei campioni controllo (fig. 5.2A) e in quelli infettati solo da *B. fragilis* WT (fig. 5.2B) o da *B. fragilis* Δ PSA (fig. 5.2C) che presentavano una regolare architettura epatica.

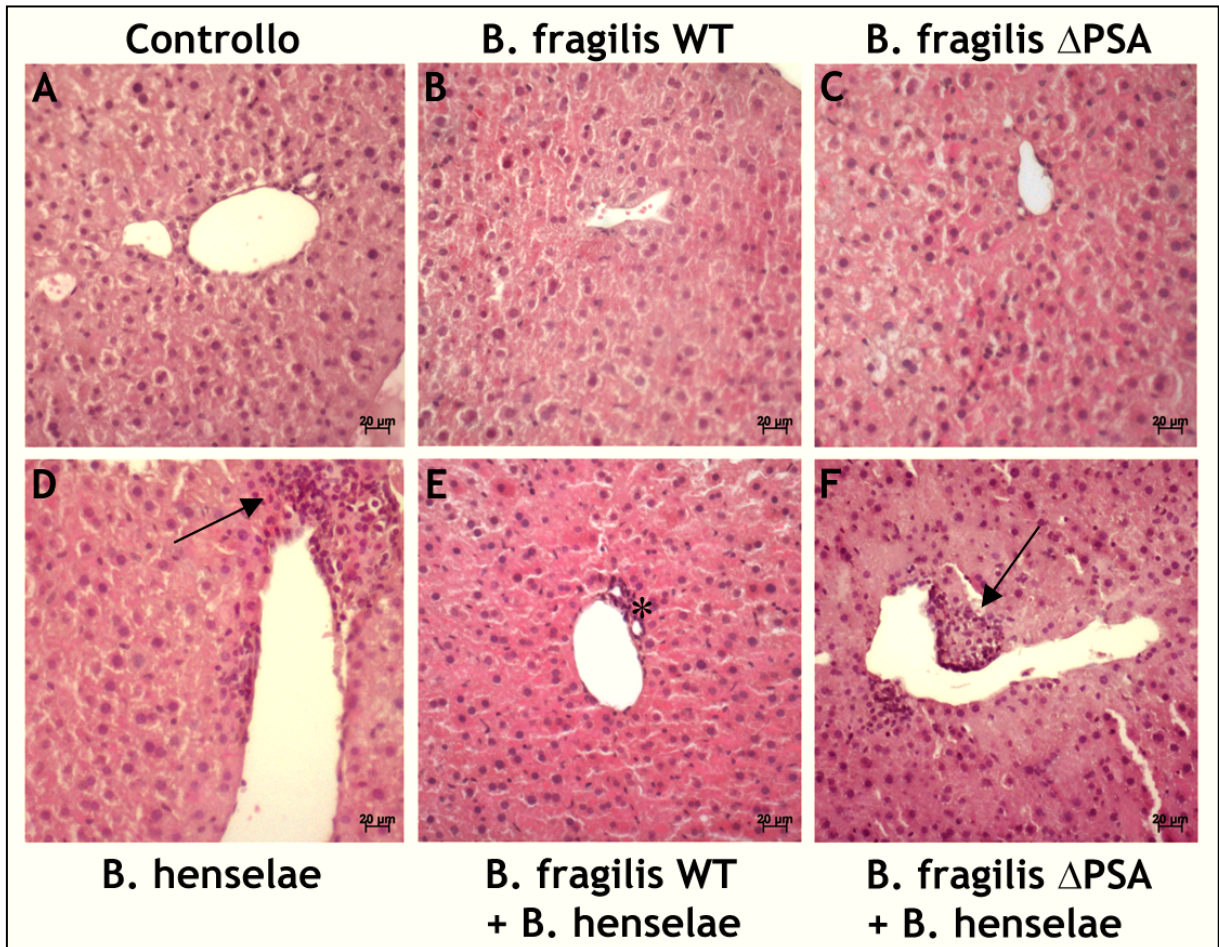


Figura 5.2: Analisi istologica di sezioni di fegato colorate con emallume-eosina; **(A)** fegato di topo controllo con regolare architettura epatica. Si nota la regione della triade epatica circondata da cordoni di epatociti; **(B)** fegato di topo infettato da *B. fragilis* WT con regolare architettura epatica. Si nota una vena centro lobulare circondata da cordoni di epatociti; **(C)** fegato di topo infettato da *B. fragilis* Δ PSA. Si nota una vena centro lobulare circondata da cordoni di epatociti; **(D)** fegato di topo infettato da *B. henselae*. Si nota la presenza di un granuloma (freccia) di grosse dimensioni nella regione sotto endoteliale di una vena centrolobulare; **(E)** fegato di topo co-infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*. Si nota la regione della triade portale con presenza perivascolare di poche cellule infiammatorie infiltrate (*); **(F)** fegato di topo co-infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*. Si nota la presenza di una formazione granulomatosa di dimensioni ridotte (freccia) a livello della vena centrolobulare.

Nell'aorta si è riscontrato solo rigonfiamento focale endoteliale nei campioni infettati da *B. henselae* (fig. 5.3D). Tale rigonfiamento risulta ridimensionato nei campioni co-infettati da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* (fig. 5.3F) e minimo nei campioni co-infettati da *B. henselae* e *B. fragilis* WT (fig. 5.3E). L'intima risulta essere regolare nei campioni controllo e in quelli infettati unicamente da *B. fragilis* WT (fig. 5.3B) o da *B. fragilis* Δ PSA (fig. 5.3C). La tonaca media e la tonaca avventizia risultano invece prive di alterazioni in tutti i trattamenti analizzati (fig. 5.3A-F).

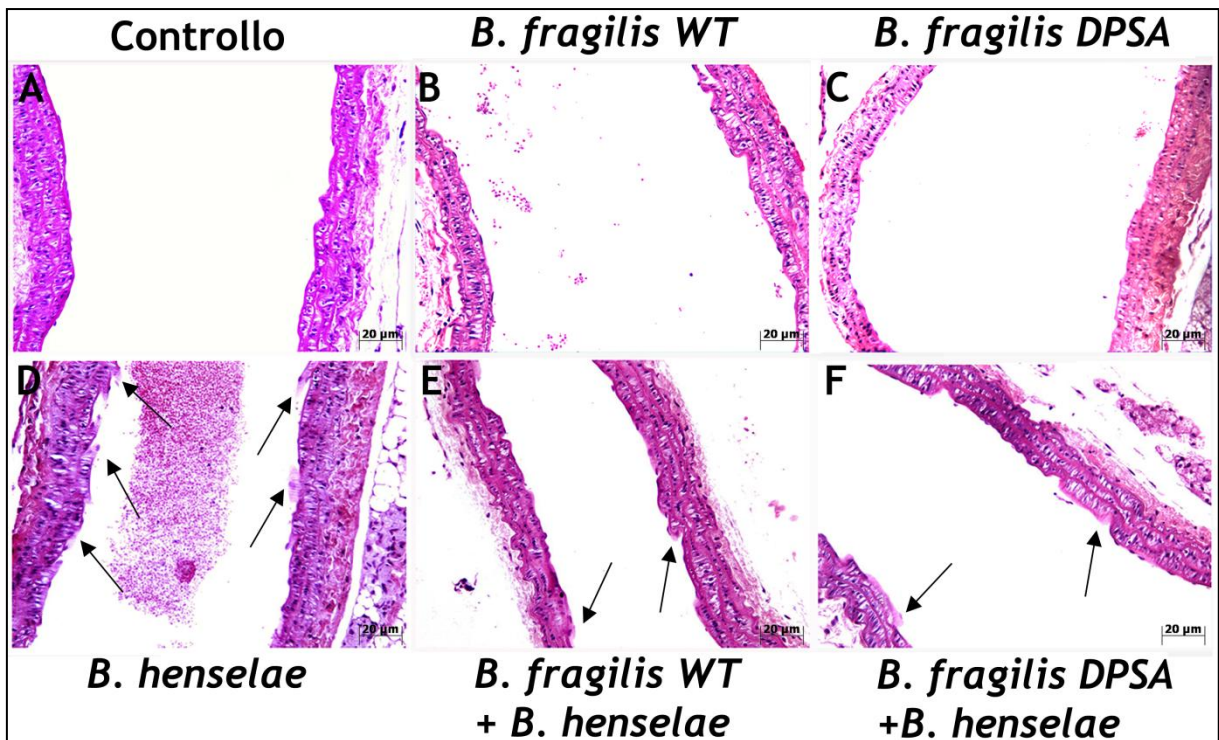


Figura 5.3: Analisi istologica di sezioni di aorta colorate con emallume-eosina: **(A)** aorta di topo controllo con regolare morfologia della tonaca intima, media e avventizia; **(B)** aorta di topo infettato da *B. fragilis* WT con regolare morfologia della tonaca intima, media e avventizia; **(C)** aorta di topo infettato da *B. fragilis* Δ PSA con regolare morfologia della tonaca intima, media e avventizia; **(D)** aorta di topo infettato da *B. henselae* con focali rigonfiamenti endoteliali (freccie) e regolare morfologia delle tonache media e avventizia; **(E)** aorta di topo co-infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae* con focali lievi rigonfiamenti endoteliali e regolare morfologia delle tonache media e avventizia (freccie); **(F)** aorta di topo co-infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* con focali rigonfiamenti endoteliali (freccie) e regolare morfologia delle tonache media e avventizia.

5.1.3 Analisi ultrastrutturale

L'analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) eseguita su fegati di topi infettati con *B. fragilis* sia WT (fig. 5.4C) che Δ PSA (fig. 5.4D) ha rivelato

un'architettura regolare del tessuto epatico senza evidenza di una risposta infiammatoria e immunitaria, così come nei topi controllo (fig. 5.4A-B).

L'osservazione al TEM del fegato di topi infettati da *B. henselae* ha rivelato, invece, la presenza di granulomi di notevoli dimensioni (fig. 5.4E-F), conseguenza di un stato infiammatorio cronico indotto dal batterio stesso. Tali granulomi sono caratterizzati dalla presenza di neutrofili (fig. 5.4E) e rari batteri (fig. 5.4G), il che indica una risposta immunitaria ancora in corso.

Nessuna risposta infiammatoria pronunciata, invece, si è riscontrata nei campioni di fegato di topi co-infettati da *B. henselae* e il ceppo selvatico di *B. fragilis*. All'interno di questi campioni, l'analisi ultrastrutturale non ha rivelato evidenti alterazioni ultrastrutturali (fig. 5.5A-B) se non per la presenza rara di pochi macrofagi nelle regioni delle triadi portali e intorno alle vene centrolobulari. Al contrario, nel fegato dei topi co-infettati con *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*, si è dimostrato ancora una volta la presenza di granulomi (fig. 5.5C), anche se di dimensioni ridotte rispetto quelli osservati in topi infettati da *B. henselae*, confermando il ruolo del PSA nell'immunomodulazione.

In tutti i campioni di fegato infettati dalla sola *B. henselae* e in quelli co-infettati da *B. fragilis* WT e *B. henselae* o da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* analizzati non abbiamo osservato la presenza di invasomi, ma solo di rari batteri evidenziati oltre che all'interno dei granulomi, anche nello spazio di Disse (fig. 5.6A-C). Non sono stati ritrovati batteri all'interno degli epatociti, né le giunzioni cellulari tra di essi sono mai state trovate alterate in tutti i campioni analizzati (fig. 5.6D).

Nell'aorta di tutti i campioni analizzati, ultrastrutturalmente non si sono osservate evidenti alterazioni né a livello della tonaca intima, né a livello della tonaca media (fig. 5.7A-F), fatta eccezione per focali rigonfiamenti dell'endotelio nei campioni infettati da *B. henselae* e co-infettati da *B. fragilis* WT e *B. henselae* e da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* (fig. 5.8D-F).

Non si è osservata la presenza di formazioni granulomatose in nessuno dei campioni analizzati (fig. 5.9A-F). L'unica eccezione è stata la presenza di globuli bianchi, non organizzati a formare un granuloma, visti nella tonaca avventizia dell'aorta di topi infettati da *B. henselae* (fig. 5.9D).

Anche nell'aorta, non si è osservata la presenza di invasomi ma solo di rari batteri sia nella tonaca intima che a livello della tonaca media solo nei campioni infettati da *B. henselae* e co-infettati da *B. fragilis* WT e *B. henselae* o da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* (fig. 5.10A-F).

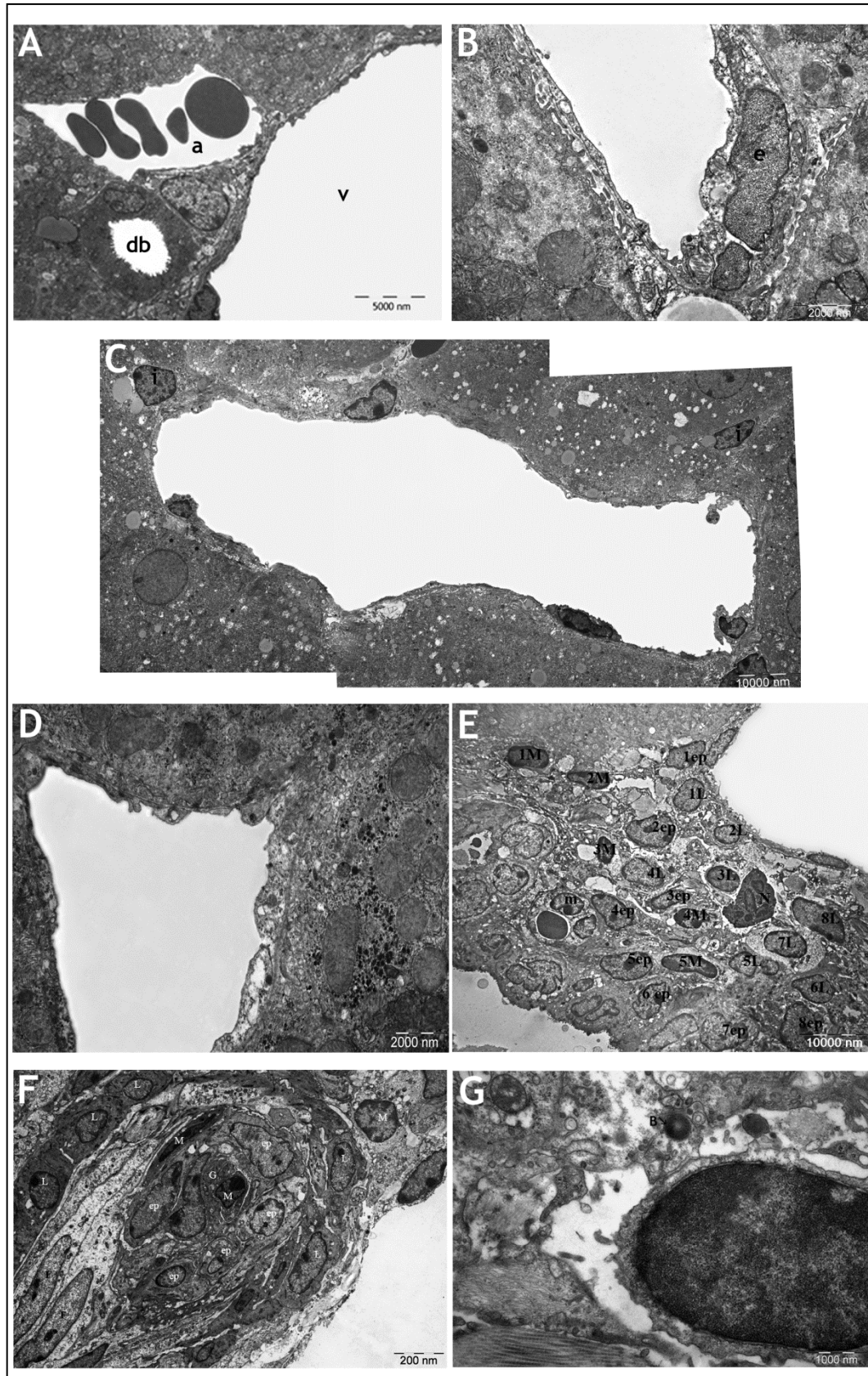


Figura 5.4: Micrografie al TEM di fegato di topo (**A-B**) controllo, (**C**) infettato da *B. fragilis* WT, (**D**) infettato da *B. fragilis* Δ PSA, (**E-G**) infettato da *B. henselae*; (**A**) triade portale caratterizzata da una diramazione della vena porta (v), una diramazione dell'arteria epatica (a) e un dotto biliare(db)

delimitato da epitelio cubico; **(B)** vena centrolobulare il cui lume è delimitato da cellule endoteliali (e); **(C)** area della vena centrolobulare priva di alterazioni e presenza di cellule di Ito (i) con le caratteristiche gocce lipidiche citoplasmatiche contenenti vitamina A; **(D)** area della vena centrolobulare priva di alterazioni; **(E)** granuloma di notevoli dimensioni a livello della triade portale. Il granuloma oltre a presentare macrofagi (M), linfociti (L) e cellule epitelioidei (ep) presenta anche neutrofili (N); **(F)** granuloma a livello della vena centrolobulare delimitato da una corona di linfociti (L) e presentante macrofagi (M), cellule epitelioidei (ep) e fibroblasti (F); **(G)** presenza di batteri (B) non aggregati all'interno del granuloma.

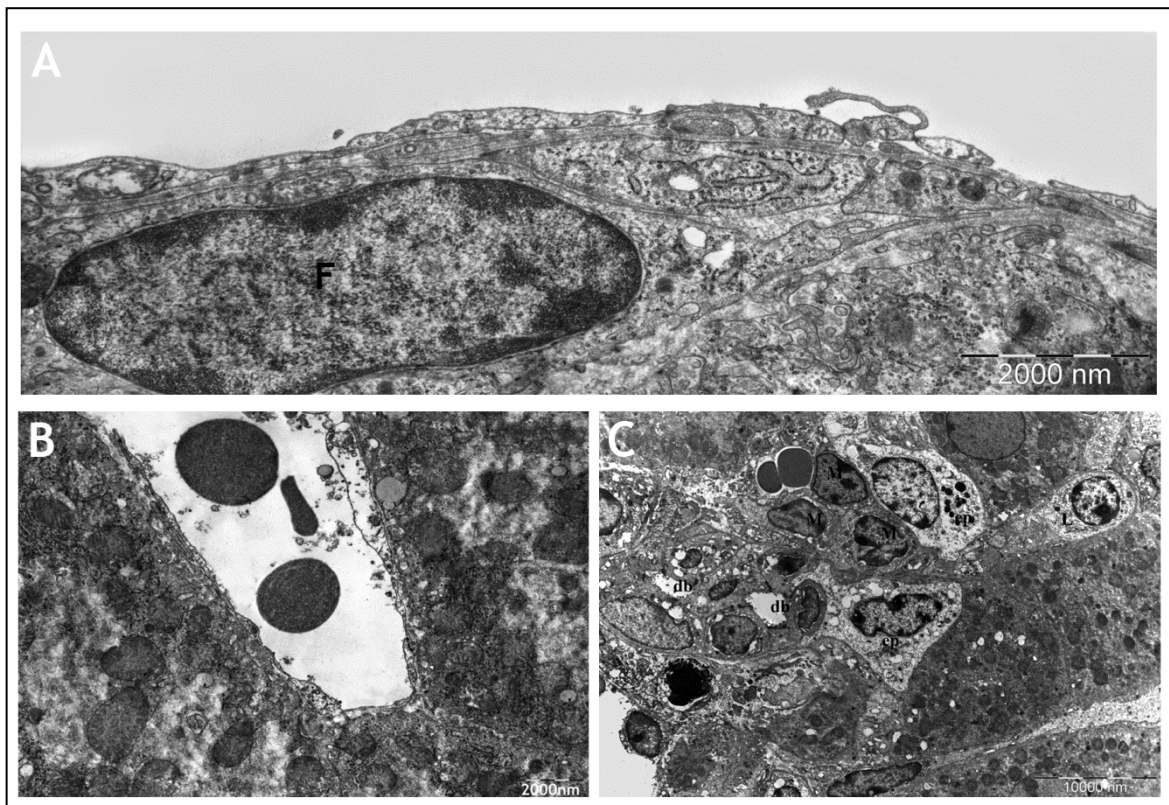


Figura 5.5: Micrografie al TEM di fegato di topo **(A-B)** co-infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae* e **(C)** co-infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; **(A)** vena centrolobulare con presenza di un fibroblasto (F) al di sotto dell'endotelio; **(B)** regolare vena centrolobulare e epatociti che si diramano da essa priva di alterazioni ultrastrutturali; **(C)** granuloma caratterizzato dalla presenza di macrofagi (M), cellule epitelioidei (ep) e linfociti (L) a livello della triade portale come si nota dalla presenza di un dotto biliare (db) regolarmente delimitato da cellule epiteliali cubiche.

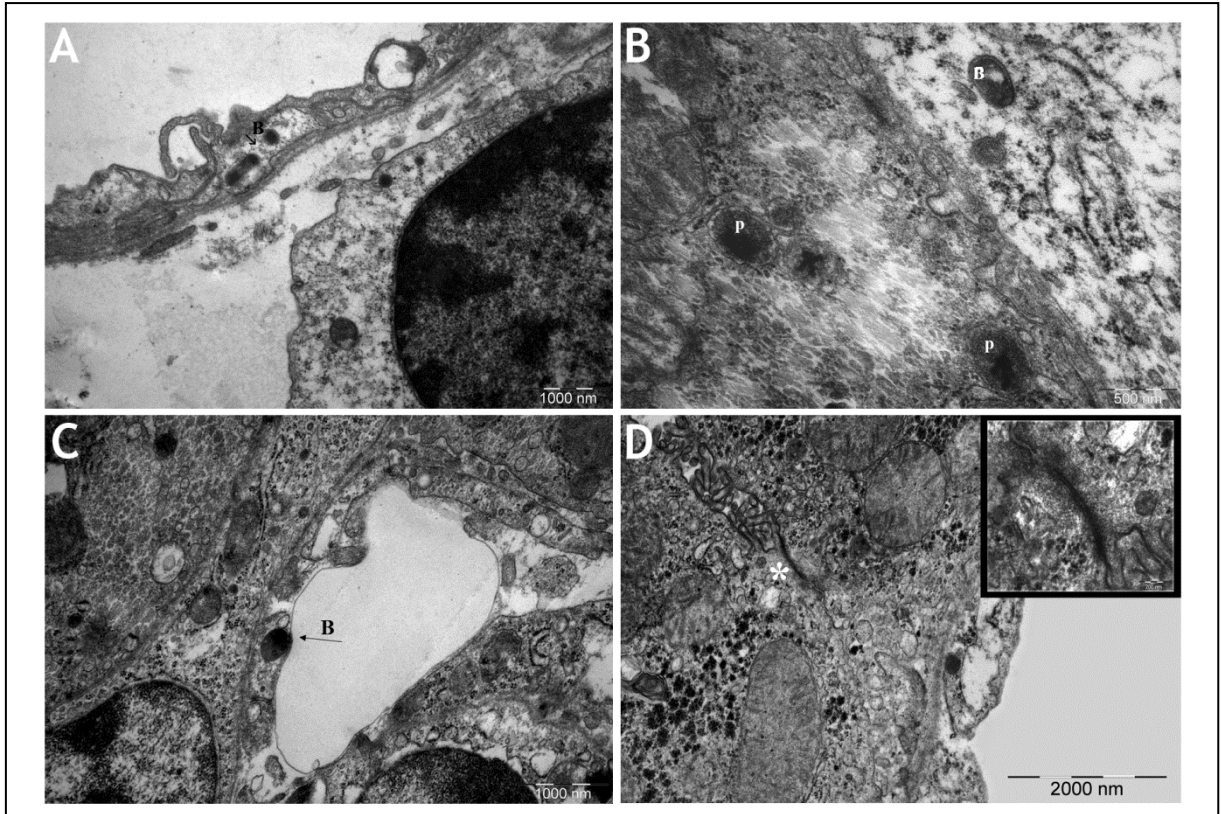


Figura 5.6: Micrografie al TEM di fegato di topo **(A)** infettato da *B. henselae*, **(B)** co-infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, **(C)** co-infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*, **(D)** infettato da *B. henselae*; **(A)** *B. henselae* (B) a livello dello spazio di Disse; **(B)** *B. henselae* (B) nello spazio di Disse (destra) e epatocita caratterizzato dalla presenza di perossisomi (P)(sinistra); **(C)** *B. henselae* a livello dello spazio di Disse; **(D)** giunzione stretta(*) tra due epatociti fondamentale nella formazione del canalicolo biliare; (inset) ingrandimento della giunzione stretta che appare come una struttura a tre binari elettrondensi: i due piú esterni sono rappresentati dagli strati fosfolipidici piú interni delle due cellule coinvolte nella giunzione, quello piú interno è dato dalla fusione dei due strati fosfolipidici esterni delle due cellule.

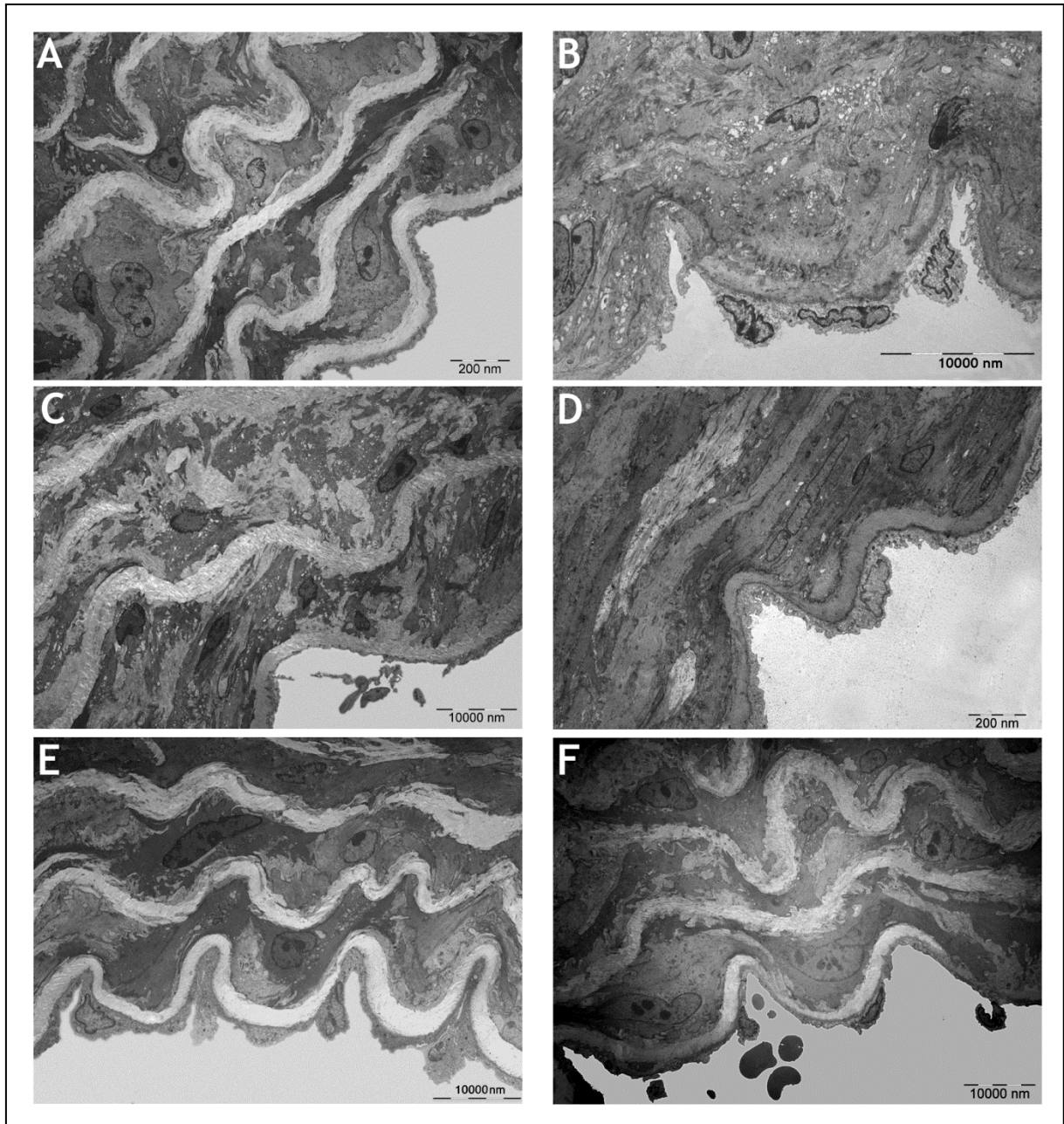


Figura 5.7: Micrografie al TEM di aorta di topo **(A)** controllo, **(B)** infettato da *B. fragilis* WT, **(C)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA, **(D)** infettato da *B. henselae*, **(E)** infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, **(F)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; **(A-F)** in tutti i campioni analizzati la tonaca intima, ovvero lo strato più interno del vaso si presenta regolarmente costituita da un monostrato di cellule endoteliali in contatto diretto con il sangue e con una membrana basale. La tonaca media si presenta anch'essa regolarmente costituita da fibrocellule di muscolatura liscia intervallate da fibre elastiche.

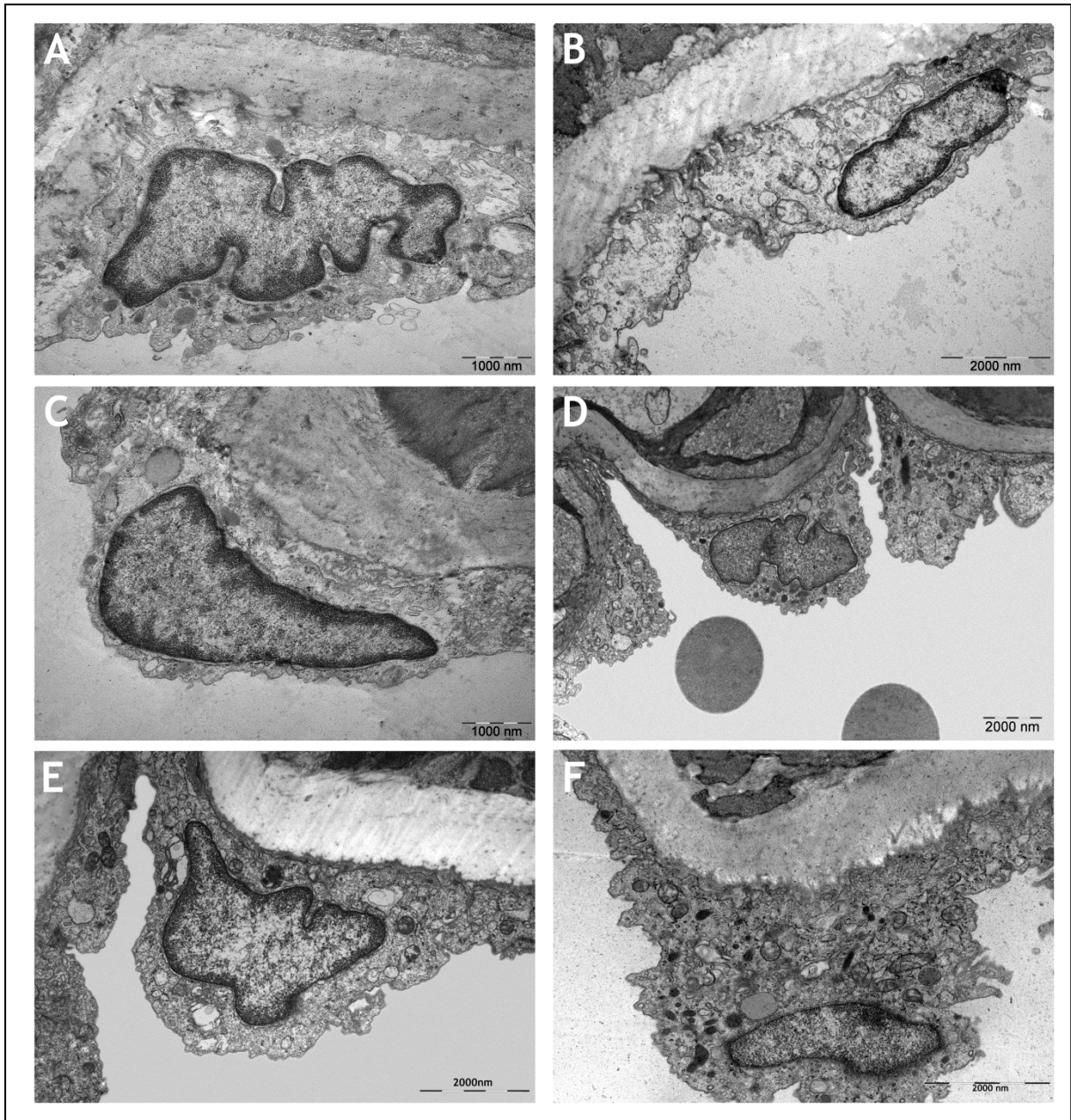


Figura 5.8: Micrografie al TEM di aorta di topo **(A)** controllo, **(B)** infettato da *B. fragilis* WT, **(C)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA, **(D)** infettato da *B. henselae*, **(E)** infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, **(F)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; **(A-C)** tipico endotelio-cita con nucleo allungato e citoplasma stretto e adeso alla membrana plasmatica; **(D-F)** endotelio-cita rigonfio, prominente verso il lume del vaso e con citoplasma voluminoso e non strettamente adeso alla membrana basale.

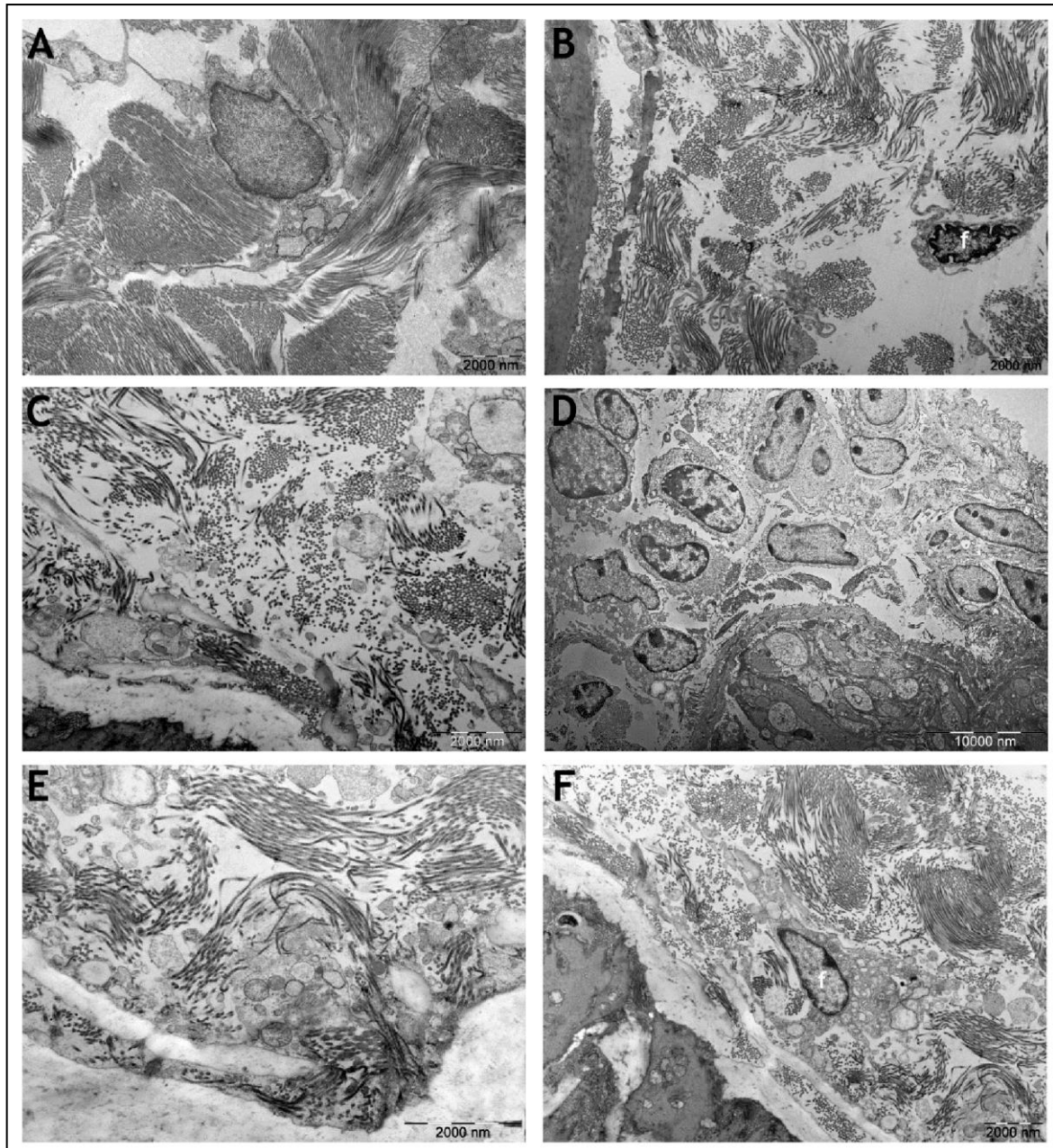


Figura 5.9: Micrografie al TEM di aorta di topo **(A)** controllo, **(B)** infettato da *B. fragilis* WT, **(C)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA, **(D)** infettato da *B. henselae*, **(E)** infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, **(F)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; **(A)** tonaca avventizia ovvero lo strato piú esterno dei vasi, costituita da fibrociti e fasci di collagene intrecciati tra loro; **(B)** tonaca avventizia con la presenza di un fibroblasto (f) e di fasci di collagene; **(C)** tonaca avventizia costituita da regolari fasci di collagene; **(D)** presenza di un infiltrato di cellule bianche ma non aggregate a formare un granuloma; **(E)** tonaca avventizia regolarmente costituita da fibre di collagene; **(F)** tonaca avventizia con presenza di un fibroblasto (f) e fasci di collagene.

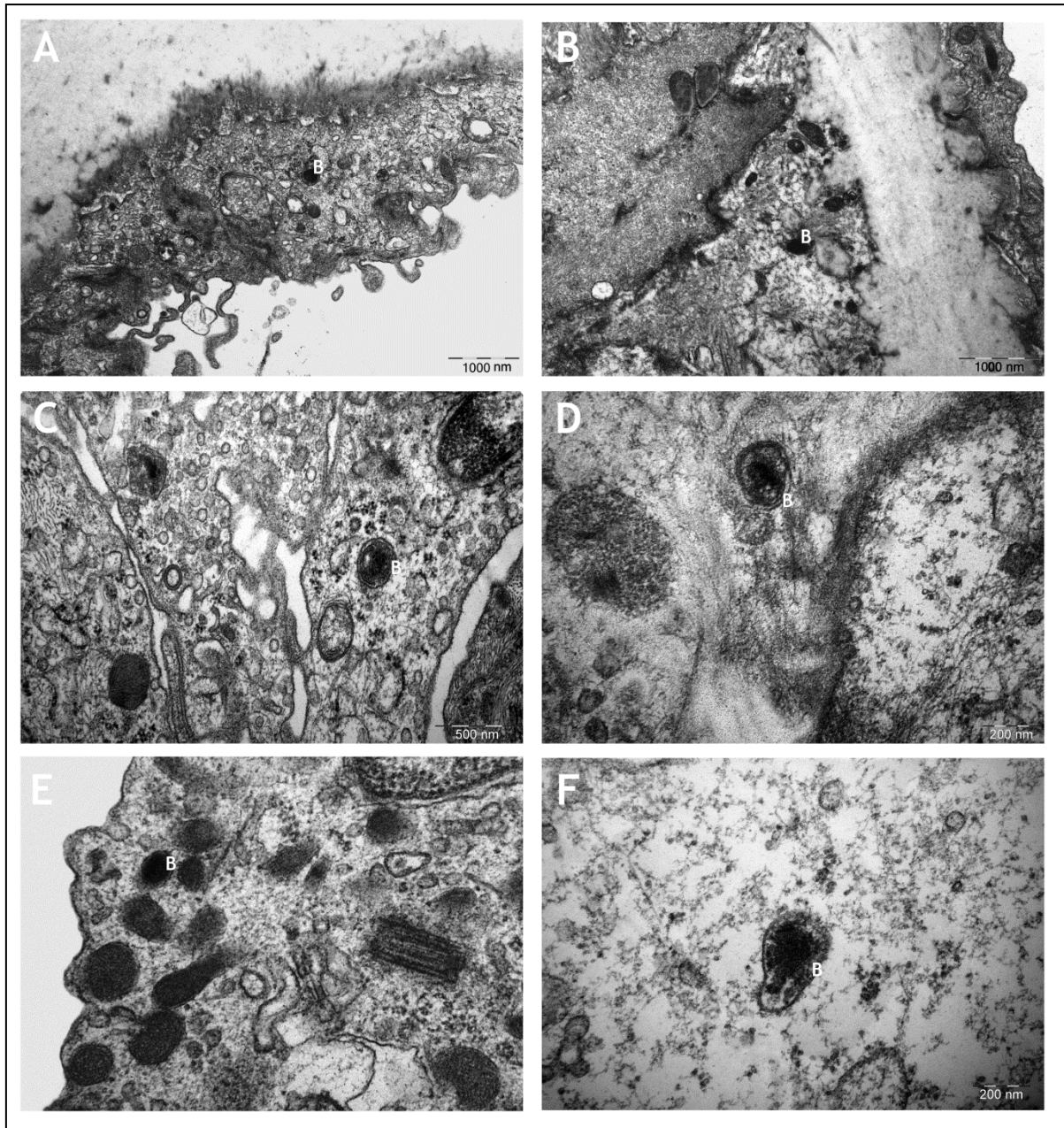


Figura 5.10: Micrografie al TEM di aorta di topo (A-B) infettato da *B. henselae*, (C-D) co-infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, (E-F) co-infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; (A) *B. henselae* (B) all'interno di un endotelio-cita; (B) *B. henselae* (B) a livello della tonaca media; (C) *B. henselae* (B) all'interno di un endotelio-cita; (D) *B. henselae* (B) a livello della tonaca media; (E) *B. henselae* (B) all'interno di un endotelio-cita; (F) *B. henselae* (B) a livello della tonaca media.

CAPITOLO 6

Risultati: parte II

6.1 Effetti del PSA in topo SCID

6.1.1 Analisi morfologica

Indagini morfologiche sono state condotte su sezioni fini, colorate con blu di toluidina, di fegato e aorta di topi SCID sottoposti agli stessi trattamenti predisposti per i topi immunocompetenti analizzati precedentemente.

La morfologia del fegato dei topi controllo (fig. 6.1A) risulta non presentare differenze rispetto alla morfologia dei campioni di fegato controllo di topi immunocompetenti (fig. 6.1B; 6.2A). I campioni di fegato infettati da *B. fragilis* WT (fig. 6.2B) non presentano alterazioni evidenti, mentre quelli infettati da *B. fragilis* Δ PSA (fig. 6.2C) presentano una moderata presenza di fibre di collagene distribuite intorno ai vasi principali. I campioni infettati da *B. henselae* (fig. 6.2D-E) presentano aree di notevoli dimensioni ricche di collagene e cellule bianche nelle regioni periportali e nella regione circostante le vene centrolobulari. Tali aree appaiono di dimensioni ridotte nei campioni di fegato co-infettati da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* (fig. 6.2G) e minime nei campioni co-infettati da *B. fragilis* WT e *B. henselae* (fig. 6.2F).

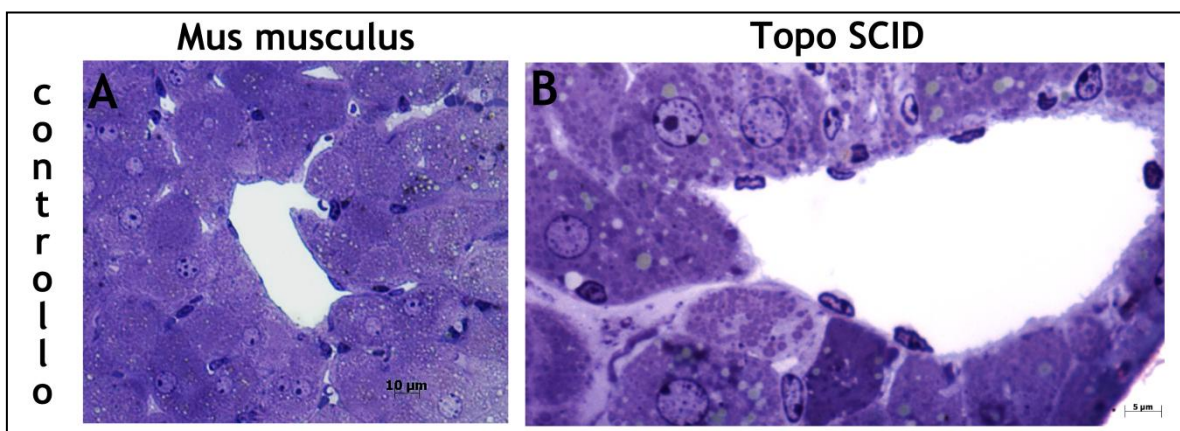


Figura 6.1: Sezioni fini di fegato colorate con blu di toluidina di (A) *Mus musculus* controllo e (B) topo SCID controllo; (A) area della vena centrolobulare verso cui affluiscono i sinusoidi che si aprono tra le

lamine di epatociti; **(B)** area della vena centrolobulare presentante la medesima morfologia osservata nel topo immunocompetente.

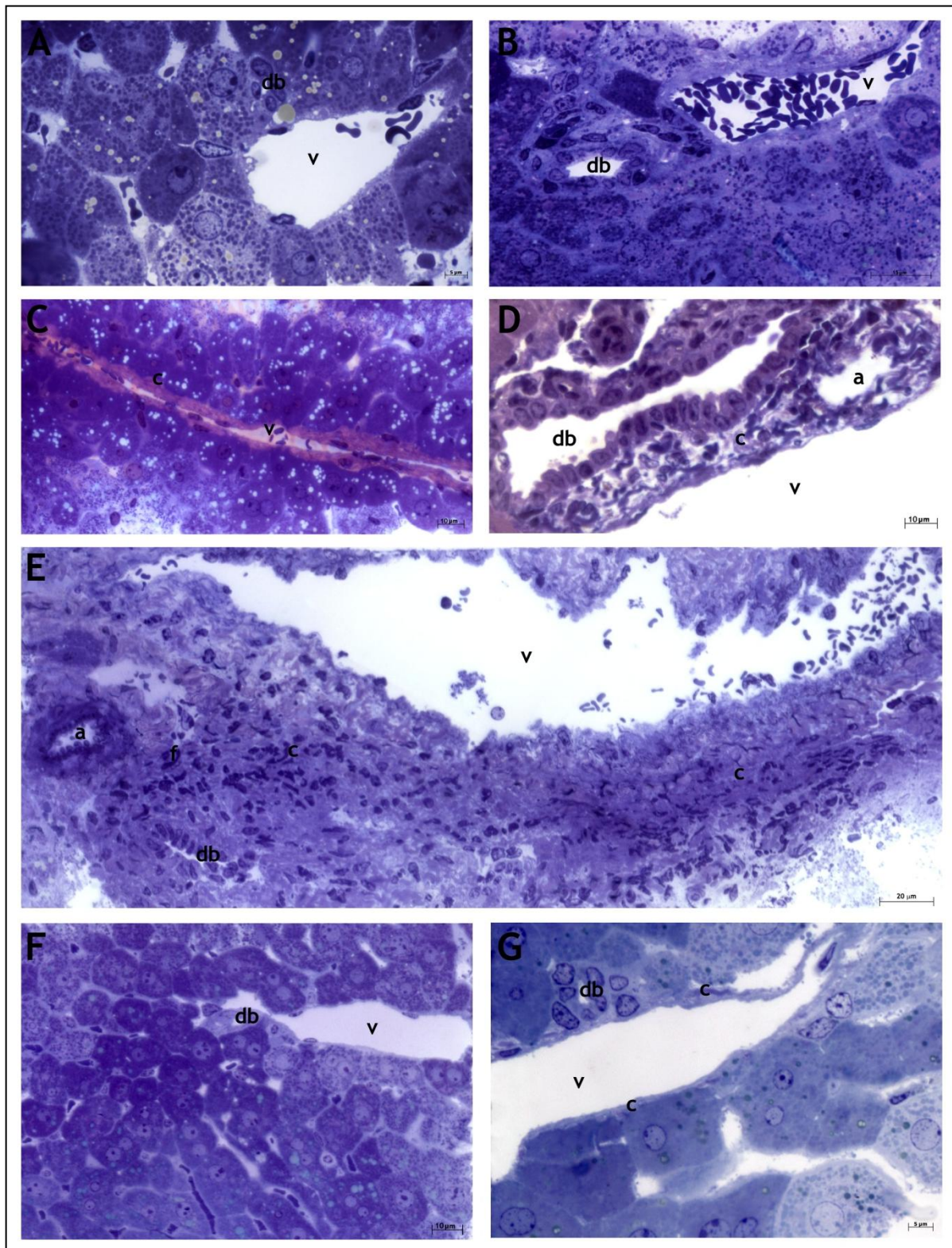


Figura 6.2: Sezioni fini di fegato colorate con blu di toluidina di topo SCID **(A)** controllo, **(B)** infettato da *B. fragilis* WT, **(C)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA, **(D-E)** infettato da *B. henselae*, **(F)** co-infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, **(G)** co-infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; **(A)** triade portale

costituita da una diramazione della vena porta (v) e un dotto biliare (db) costituito da cellule epiteliali cubiche; **(B)** la triade portale con, in evidenza, la diramazione della vena porta (v) e il dotto biliare (db) non mostra alterazioni morfologiche; **(C)** ramo della vena porta (v) con particolare accumulo di collagene di sostegno (c); **(D)** triade portale regolarmente composta da arteria epatica (a) diramazione della vena porta (v) e dotto biliare (db) ma con notevole accumulo di collagene (c); **(E)** triade portale regolarmente composta da arteria epatica (a) ramo della vena porta (v) e dotto biliare (db), è evidente l'abbondante accumulo di collagene (c) e una massiva presenza di cellule di forma stellata simil-fibroblasti (f); **(F)** triade portale con il ramo della vena porta (v) e il dotto biliare (db) completamente privo di alterazioni morfologiche; **(G)** triade portale con un ramo della vena porta (v) con presenza diffusa di collagene (c) al di sotto dell'endotelio e un regolare dotto biliare (db).

Le indagini morfologiche su sezioni fini di aorta colorate con blu di toluidina hanno evidenziato la regolare architettura istologica dei campioni controllo (fig. 6.3A) rispetto ai campioni di aorta dei topi immunocompetenti (fig 6.3B; 6.4A).

I campioni infettati da *B. fragilis* WT (fig. 6.4B) e *B. fragilis* Δ PSA (fig. 6.4C) non hanno mostrato significative alterazioni morfologiche. L'intima dei campioni infettati da *B. henselae* (fig. 6.4D) si presenta ispessita come nei campioni co-infettati da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* (fig. 6.4F) dove le cellule endoteliali sono anche spesso vacuolizzate. L'intima dei campioni co-infettati da *B. fragilis* WT e *B. henselae* (fig. 6.4E) risulta solo leggermente rigonfia a livello di alcune cellule endoteliali.

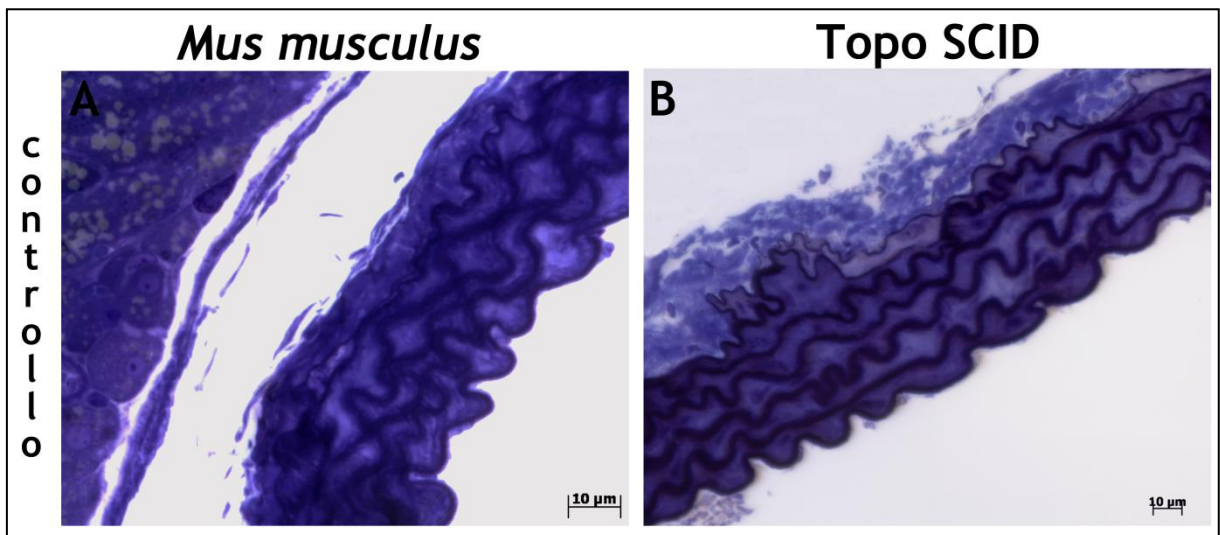


Figura 6.3: Sezioni fini di aorta colorate con blu di toluidina di **(A)** *Mus musculus* controllo e **(B)** topo SCID controllo; **(A)** dal lume verso l'esterno si osserva la tonaca intima costituita da cellule endoteliali, la tonaca media costituita da muscolatura liscia intervallata da fibre elastiche e infine la tonaca avventizia costituita da fibroblasti e fasci di collagene; **(B)** la tonaca intima, la tonaca media e la tonaca avventizia non risultano difformi da quelle del topo immunocompetente.

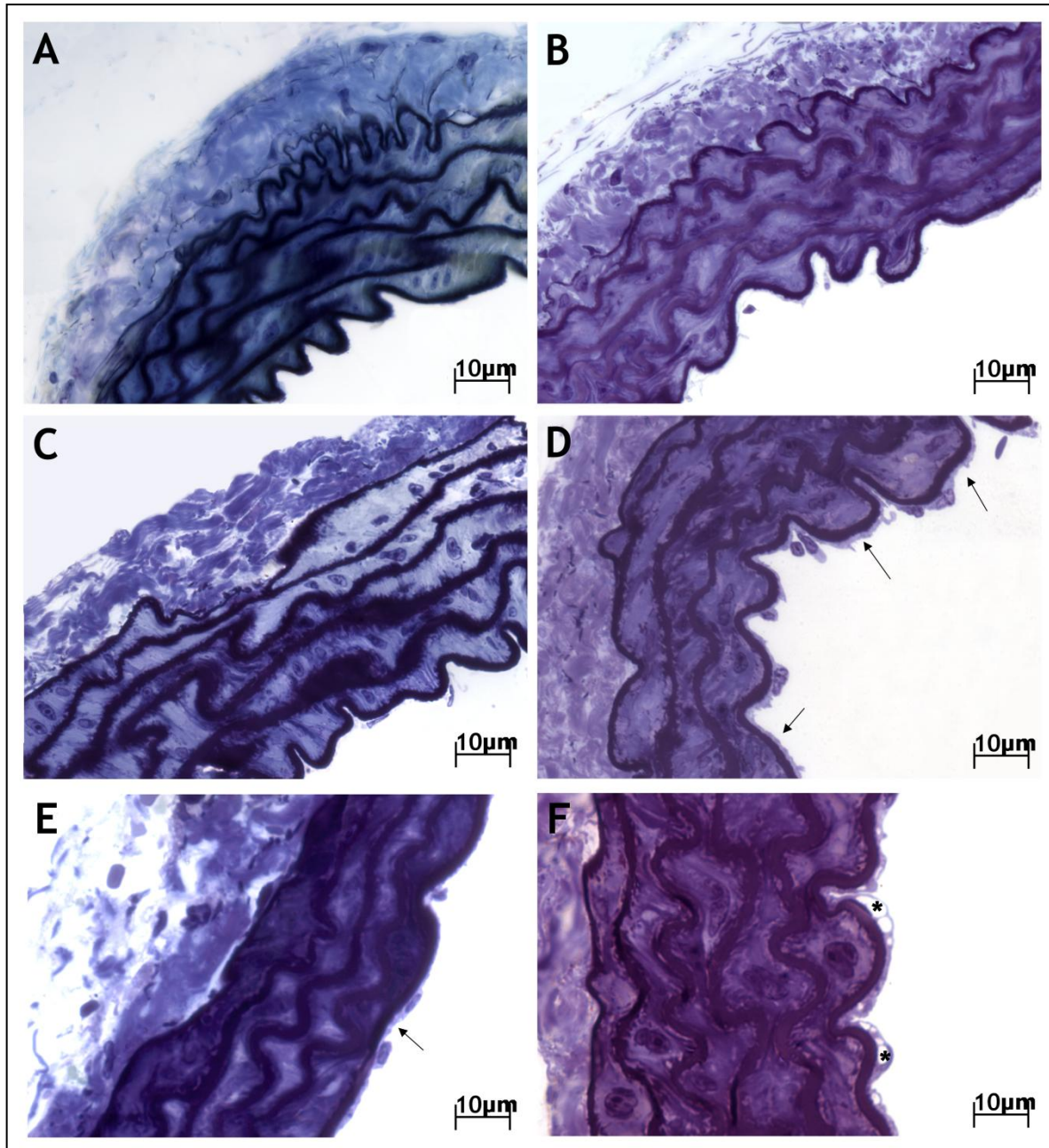


Figura 6.4: Sezioni fini di aorta colorate con blu di toluidina di topo SCID **(A)** controllo, **(B)** infettato da *B. fragilis* WT, **(C)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA, **(D)** infettato da *B. henselae*, **(E)** co-infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, **(F)** co-infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; **(A)** dal lume verso l'esterno si osserva la tonaca intima costituita da cellule endoteliali, la tonaca media costituita da muscolatura liscia intervallata da fibre elastiche e infine la tonaca avventizia costituita da fibroblasti e fasci di collagene; **(B)** la tonaca intima, la tonaca media e la tonaca avventizia non risultano alterate; **(C)** la tonaca intima, la tonaca media e la tonaca avventizia non risultano alterate; **(D)** lo strato endoteliale è ispessito per tutta la lunghezza dell'intima (freccie), mentre non vi sono alterazioni a livello della tonaca media e avventizia; **(E)** morfologia regolare dell'aorta con solo piccoli rigonfiamenti focali endoteliali (freccia); **(F)** endotelio rigonfio e ricco di vacuolizzazioni (asterischi), ma tonaca media e avventizia priva di alterazioni.

6.1.2 Analisi ultrastrutturale

Le analisi ultrastrutturali eseguite mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) non hanno evidenziato alterazioni significative nei campioni di fegato di topi SCID infettati da *B. fragilis* WT rispetto ai topi SCID di controllo (fig. 6.5A), se non per la presenza di macrofagi nella regione sottoendoteliale dei vasi principali (fig. 6.5B), mentre nei campioni infettati da *B. fragilis* Δ PSA è stata confermata intorno ai vasi principali la presenza di collagene (fig. 6.5C).

I campioni di fegato di topi SCID infettati da *B. henselae* (fig. 6.5D-G) presentano macroaree ricche di collagene (fig. 6.5D-G) sintetizzato da caratteristiche cellule di forma stellata simil-fibroblasti (fig. 6.5E-F). In tali aree sono anche presenti cellule istiocitarie (fig. 6.5D-E) e batteri intrappolati dal collagene (fig. 6.7A-B).

I campioni di fegato di topi SCID co-infettati da *B. fragilis* WT e *B. henselae* hanno mostrato la presenza di macrofagi nella regione sottoendoteliale dei vasi principali (fig. 6.6A). Qui si notano anche limitate aree con collagene al cui interno sono stati ritrovati batteri (fig. 6.7C). Nei campioni co-infettati da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* si è infine osservato, così come nei campioni infettati da *B. henselae*, la presenza di aree ricche in collagene ma di dimensioni ridotte (fig. 6.6B) al cui interno sono visibili batteri (fig. 6.7D). Le cellule endoteliali dei vasi principali presentano mitocondri nastriformi (fig. 6.6C) e alterazioni morfologiche indicanti sofferenza cellulare. E' stata inoltre osservata una particolare presenza di eosinofili nei sinusoidi (fig. 6.6D), condizione questa mai riscontrata nelle osservazioni né dei campioni di fegato di altri trattamenti né in quelli dei campioni di fegato dei topi immunocompetenti. In tutti i campioni analizzati di ciascun trattamento, non sono state riscontrate alterazioni né a livello epatocitario, né dei dotti biliari, né dei sinusoidi.

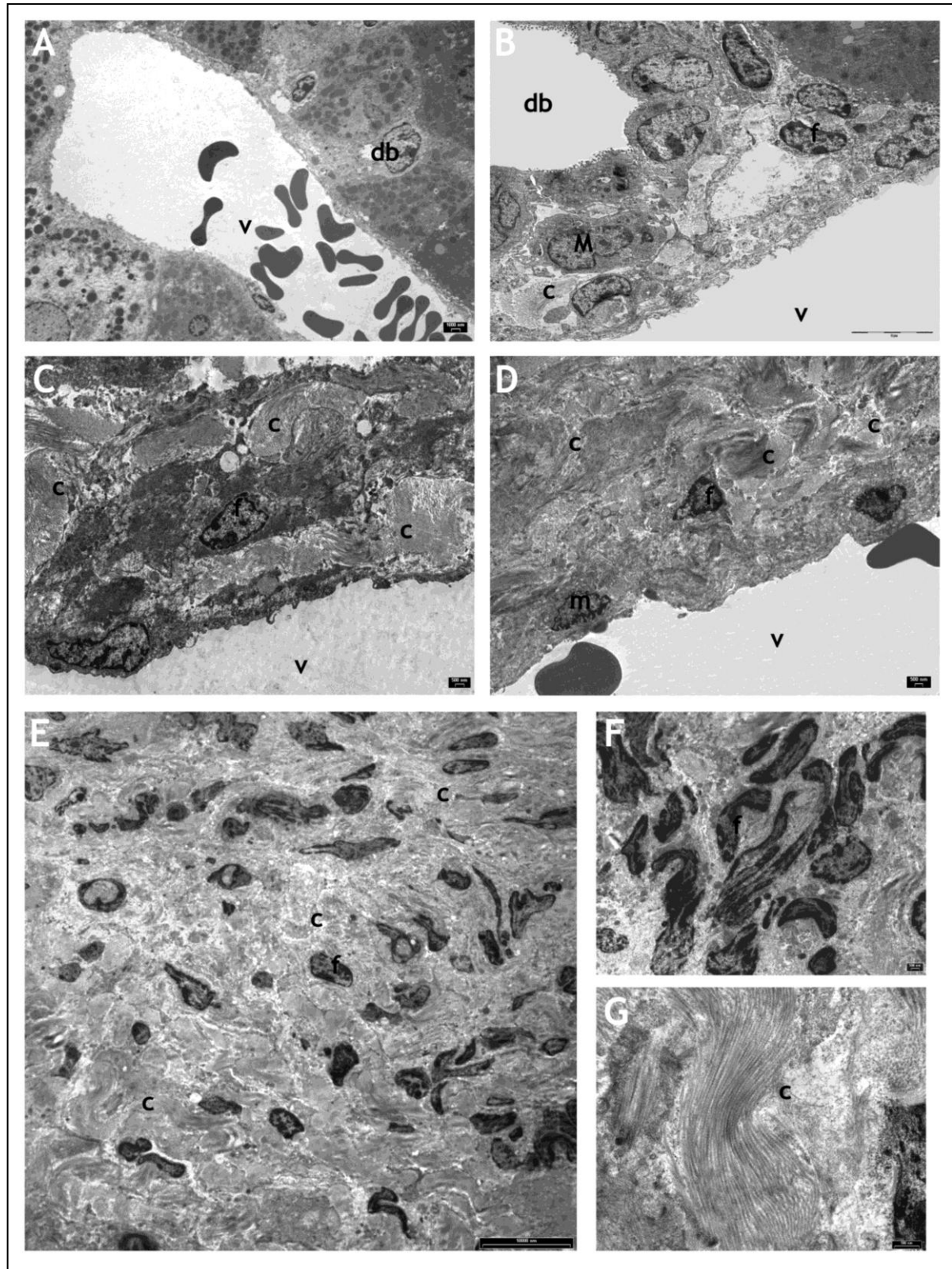


Figura 6.5: Micrografie al TEM di fegato di topo SCID **(A)** controllo, **(B)** infettato da *B. fragilis* WT, **(C)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA, **(D-G)** infettato da *B. henselae*; **(A)** triade portale caratterizzata da un piccolo dotto biliare (db) e da un ramo della vena porta (v). Radialmente ad essa sono disposti epatociti con la caratteristica forma poligonale, nucleo tondeggiante con eterocromatina periferica e presenza massiva di mitocondri e perossisomi; **(B)** triade portale con il caratteristico dotto biliare (db)

e il ramo della vena porta (v). Si osserva un leggero accumulo di collagene (c) prodotto da fibroblasti (f) e la presenza di macrofagi al di sotto dell'endotelio (M); **(C)** ramo della vena porta (v) con presenza massiva di collagene (c) al di sotto dell'endotelio; **(D)** macroarea ricca di collagene al di sotto dell'endotelio di un ramo della vena porta (v) con fibroblasti (f) e cellule mieloidi (m); **(E)** macroarea ricca di collagene (c) e di cellule di forma stellata simil-fibroblasti (f); **(F)** ingrandimento di cellule simil-fibroblasti (f) con caratteristica forma stellata; **(G)** ingrandimento di fasci di collagene (c) con il tipico bandeggio.

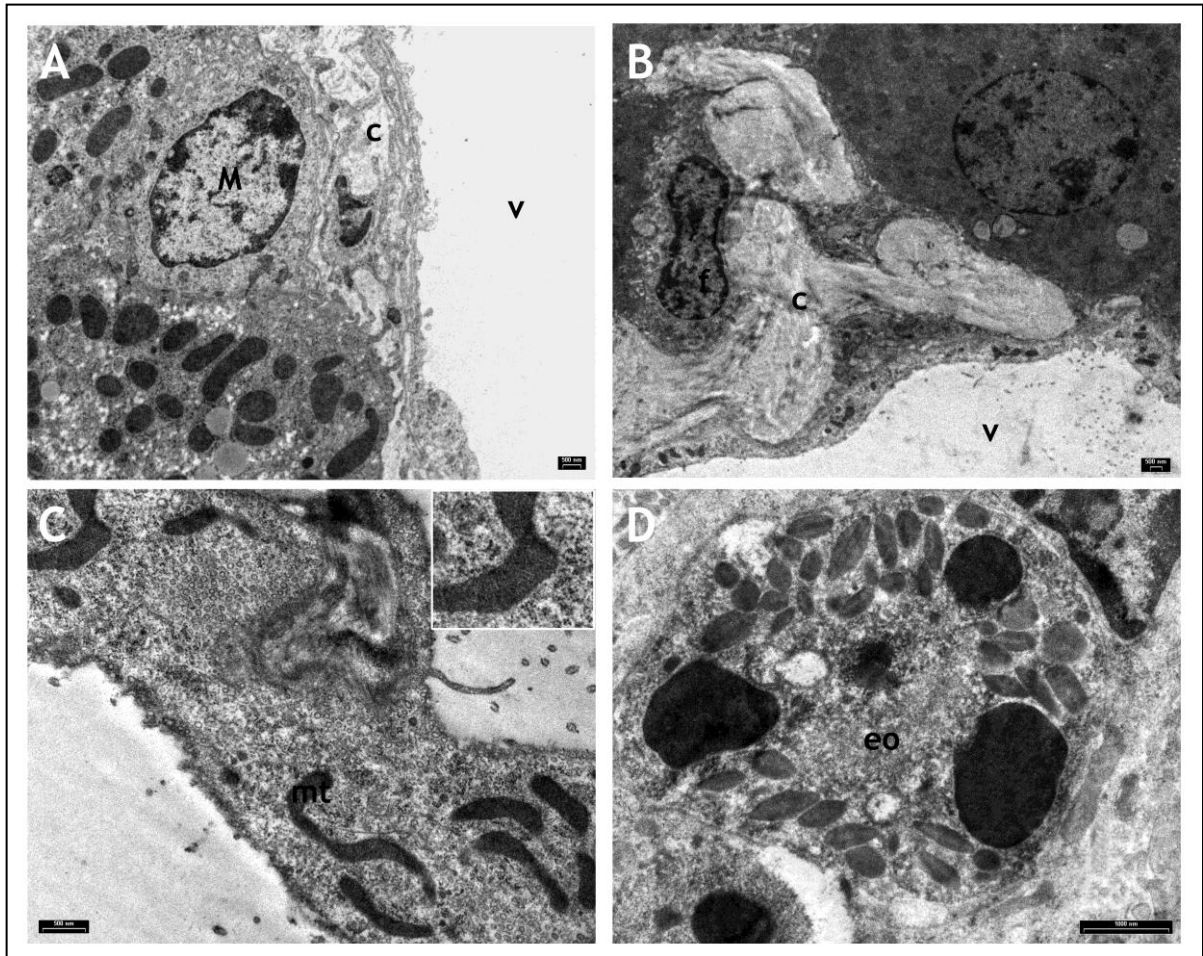


Figura 6.6: Micrografie al TEM di fegato di topo SCID **(A)** co-infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, **(B-D)** co-infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; **(A)** ramo della vena porta (v) con leggero accumulo di collagene al di sotto dell'endotelio e presenza nella medesima area di un macrofago (M); **(B)** ramo della vena porta (v) con notevole accumulo di collagene al di sotto dell'endotelio e presenza di un fibroblasto (f); **(C)** endotelio alterato caratterizzato dalla presenza di mitocondri (mt) stranamente nastriformi; (inset) ingrandimento di un mitocondrio; **(D)** presenza di eosinofili con i tipici granuli con core paracrystallino a livello dei sinusoidi.

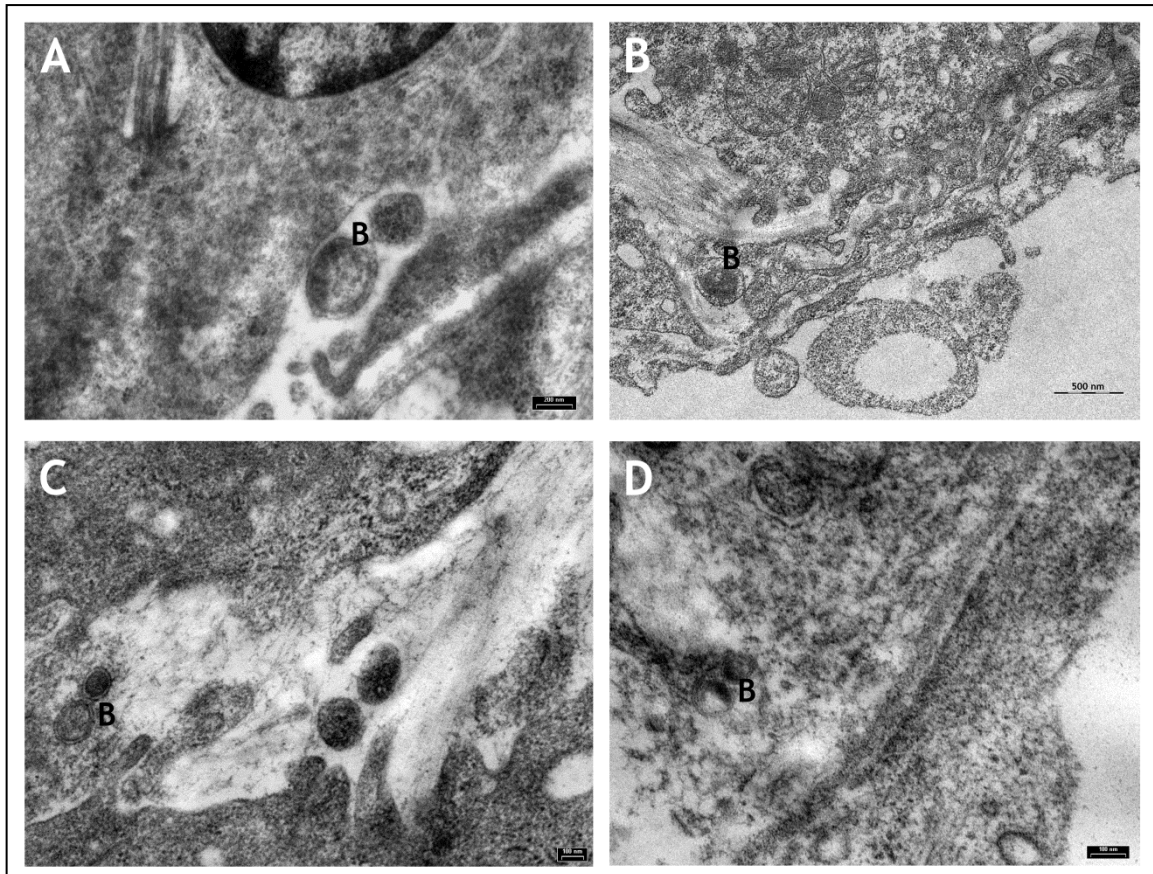


Figura 6.7: Micrografie al TEM di fegato di topo SCID (**A-B**) infettato da *B. henselae*, (**C**) co-infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, (**D**) co-infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; (**A**) *B. henselae* (B) all'interno di un'area ricca di collagene; (**B**) *B. henselae* (B) a livello dello spazio di Disse; (**C**) *B. henselae* (B) a livello dello spazio di Disse; (**D**) *B. henselae* (B) tra fibre di collagene a livello dello spazio di Disse.

Le analisi ultrastrutturali al TEM delle aorte dei topi SCID controllo (fig. 6.8A) non hanno evidenziato anomalie rispetto l'aorta dei topi immunocompetenti. La tonaca intima è regolarmente costituita da endotelioцитi adesi alla membrana basale con nucleo allungato e eterocromatina periferica (fig. 6.9A). La tonaca media costituita da fibrocellule muscolari con forma allungata e disposizione longitudinale, intervallate da fibre elastiche. La tonaca avventizia, infine costituita da fibroblasti e fasci di collagene con il caratteristico bandeggio (fig 6.10A).

Queste stesse caratteristiche sono individuabili anche nei campioni di aorta dei topi SCID infettati da *B. fragilis* WT (fig. 6.8B; 6.9B; 6.10B) e da *B. fragilis* Δ PSA (fig. 6.8C; 6.9C; 6.10C). Nei campioni infettati da *B. henselae* si osserva un ispessimento dell'endotelio (fig. 6.8D; 6.9D) mentre la tonaca media (fig. 6.8D) ed avventizia (fig. 6.10D) risultano inalterate. Nei

campioni co-infettati da *B. fragilis* WT e *B. henselae* l'endotelio risulta focalmente ispessito (fig. 6.8E; 6.9E) e vacuolizzato nei campioni co-infettati da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* (fig. 6.8F; 6.9F). Anche nel caso delle co-infezioni sia la tonaca media (Fig 6.8E-F) che la tonaca avventizia non presentano alterazioni (Fig. 6.10E-F).

In nessuno dei campioni analizzati è stata riscontrata la presenza di batteri.

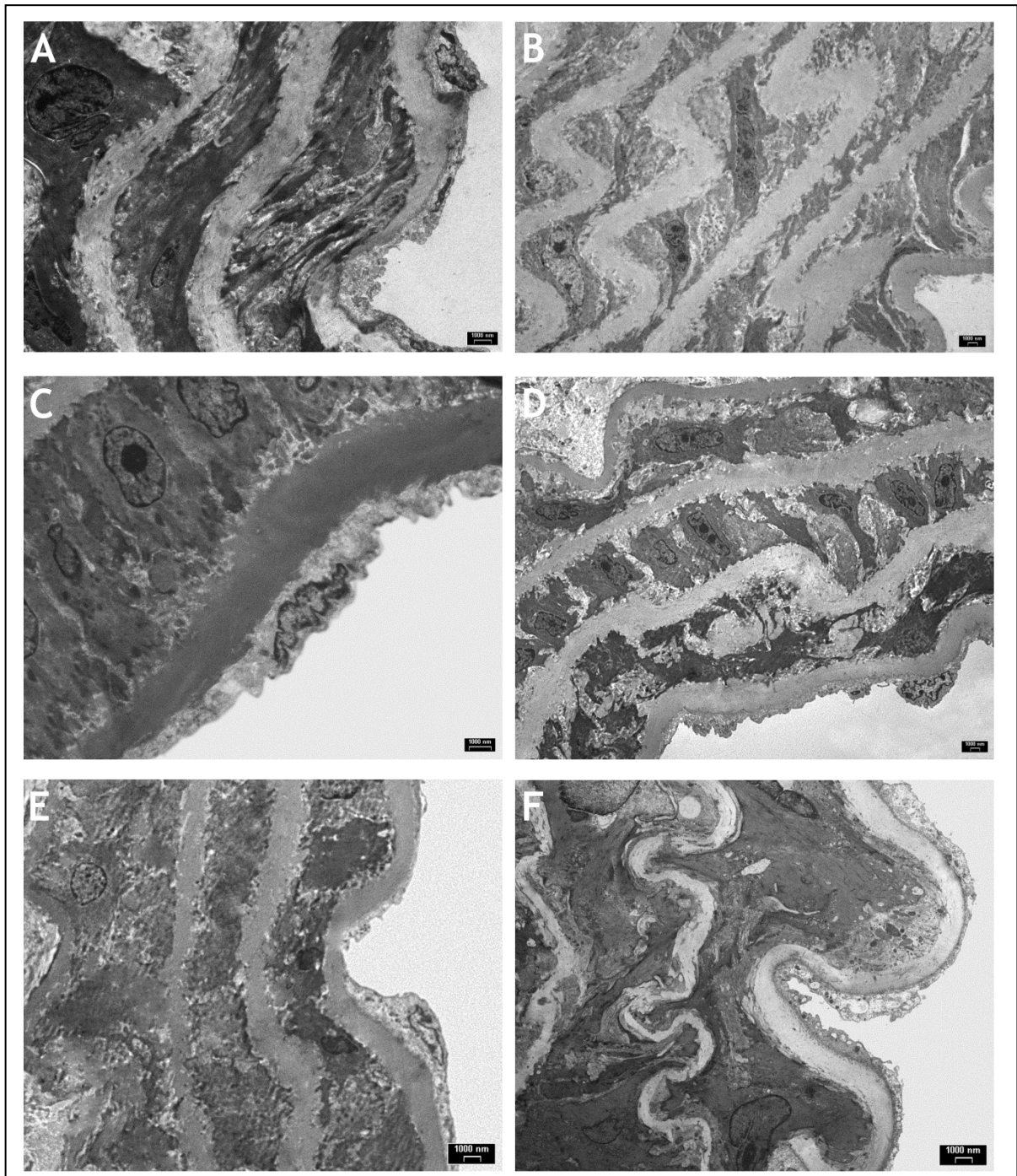


Figura 6.8: Micrografie al TEM di aorta di topo SCID (A) controllo, (B) infettato da *B. fragilis* WT, (C) infettato da *B. fragilis* Δ PSA, (D) infettato da *B. henselae*, (E) infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, (F) infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; (A-F) in tutti i campioni analizzati la tonaca

intima, ovvero lo strato più interno del vaso si presenta regolarmente costituita da un monostrato di cellule endoteliali in contatto diretto con il sangue e con una membrana basale. La tonaca media si presenta regolarmente costituita da fibrocellule di muscolatura liscia intervallate da fibre elastiche.

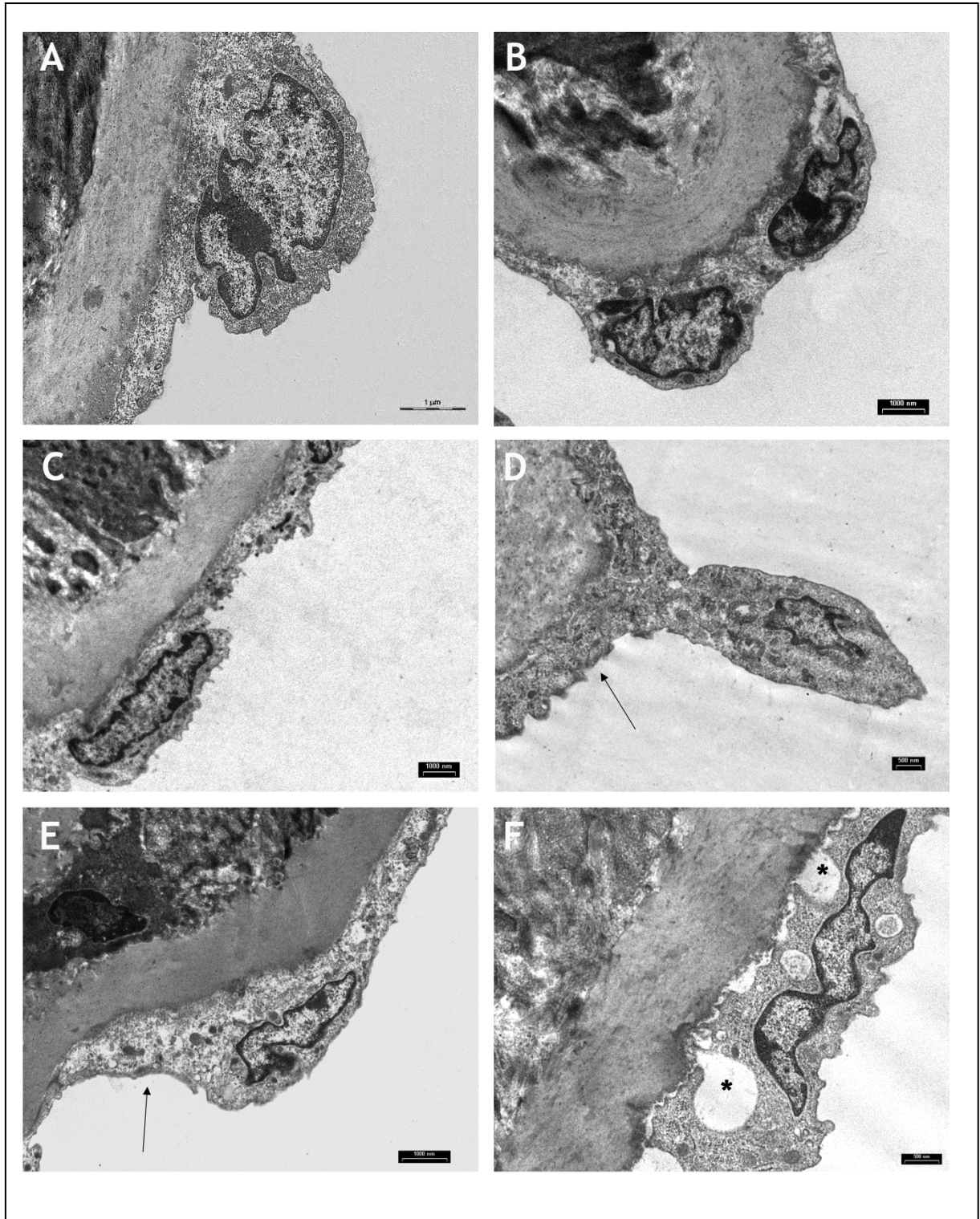


Figura 6.9: Micrografie al TEM di aorta di topo SCID **(A)** controllo, **(B)** infettato da *B. fragilis* WT, **(C)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA, **(D)** infettato da *B. henselae*, **(E)** infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, **(F)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; **(A-C)** tipico endotelio-cita con nucleo allungato e

citoplasma stretto e adeso alla membrana basale; (D) endotelio rigonfio, prominente verso il lume del vaso e con citoplasma voluminoso e non strettamente adeso alla membrana basale (freccia); (E) endotelio con citoplasma voluminoso e non strettamente adeso alla membrana basale (freccia); (F) endotelio parzialmente distaccato dalla membrana basale con citoplasma vacuolizzato ().*

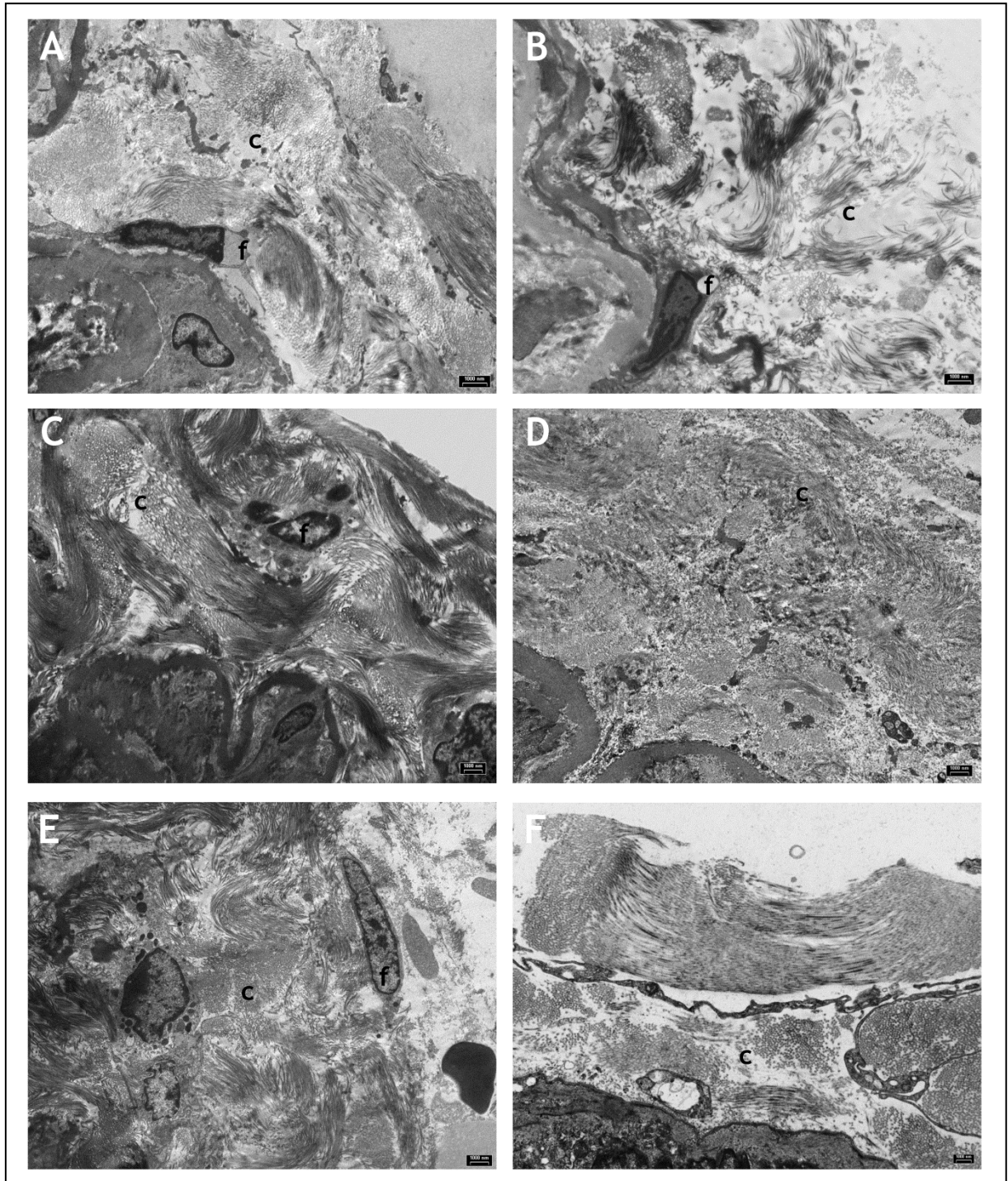


Figura 6.10: Micrografie al TEM di aorta di topo SCID **(A)** controllo, **(B)** infettato da *B. fragilis* WT, **(C)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA, **(D)** infettato da *B. henselae*, **(E)** infettato da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, **(F)** infettato da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; **(A-F)** tonaca avventizia costituita da fibroblasti (f) e fasci di collagene intrecciati tra loro (c).

CAPITOLO 7

Risultati: parte III

7.1 Effetto del PSA sulle EPC

7.1.1 Numero di EPC nei topi infetti

A 36 giorni dall'infezione, prima del sacrificio dei topi, sia immunocompetenti che immunocompromessi, il sangue è stato raccolto da tre topi per trattamento al fine di stabilire se il numero di EPC fosse influenzato dalle infezioni batteriche sia con ceppi singoli di *B. henselae*, *B. fragilis WT* e *B. fragilis ΔPSA*, sia con co-infezioni con *B. fragilis WT* e *B. henselae* o con *B. fragilis ΔPSA* e *B. henselae*.

Nei topi immunocompetenti il numero medio di EPC, misurato come cellule positive ai due marcatori specifici Sca-I e Flk-I, drasticamente diminuisce di circa il 90% in topi infettati con *B. henselae* rispetto al gruppo non infetto. Il numero di EPC però aumenta nei campioni infettati da *B. fragilis WT* ma non nei campioni infettati da *B. fragilis ΔPSA* dove si registra una leggera diminuzione, così come nelle co-infezioni con *B. fragilis WT* e *B. henselae*. Diminuzione leggermente maggiore si ha nei campioni co-infettati con *B. fragilis ΔPSA* e *B. henselae*.

I dati ottenuti sono i seguenti:

Mus musculus	% EPC			Media	SD
	1	2	3		
Controllo	4,7	5,1	5,3	5,03	0,31
B. fragilis WT	5,9	6,4	6,3	6,20	0,26
B. fragilis ΔPSA	3,1	3,0	2,9	3,00	0,10
B. henselae	0,5	0,2	0,2	0,30	0,17
B. fragilis WT + B. henselae	3,1	3,5	3,4	3,33	0,21
B. fragilis ΔPSA + B. henselae	2,4	2,3	1,8	2,17	0,32

Tabella 7.1: Percentuale di EPC in aliquote di 100μL di sangue conteggiate al FACS.

I dati ottenuti risultano significativi al test ANOVA per $p\text{-value} < 0,001$ e il valore medio di ogni trattamento risulta essere significativo rispetto a quello del gruppo controllo rispettivamente per $*p < 0,01$ e $**p < 0,001$, ottenuti con post hoc T-test. Il valore medio di EPC controllo è

stato considerato del 100% e gli altri valori medi rapportati ad esso ottenendo il grafico seguente:

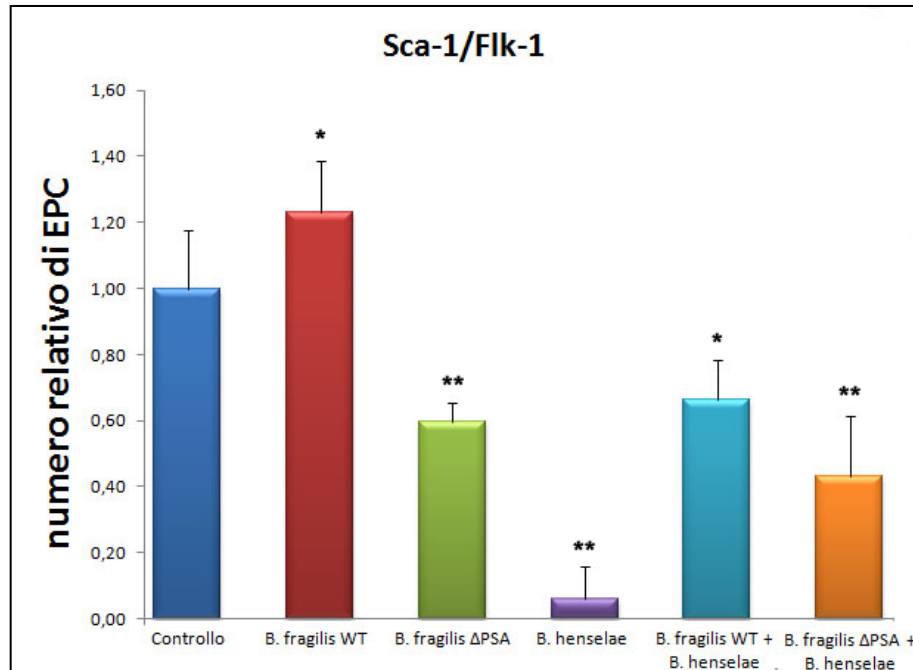


Grafico 7.1: Numero relativo medio di EPC in topi infetti rispetto ai topi di controllo misurato mediante analisi FACS. Cellule doppie positive a Sca-1/Flk-1 sono considerate come EPC murine. Le barre indicano gli errori standard. ANOVA $p < 0,001$; post-hoc T-test $*p < 0,01$, $**p < 0,001$.

Nei topi immunocompromessi, si ha un sorprendente aumento nel numero di EPC nei campioni infettati da *B. henselae* rispetto ai controlli. Inoltre non si ha variazione in numero nei campioni infettati da *B. fragilis* ΔPSA così come l'aumento nei campioni co-infettati con *B. fragilis* ΔPSA e *B. henselae* è identico a quello registrato nella sola infezione con *B. henselae*. Un aumento si ha anche in questo caso nei campioni infettati con *B. fragilis* WT e ancora di più in quelli co-infettati con *B. fragilis* WT e *B. henselae*.

I dati ottenuti sono i seguenti:

Topo SCID	% EPC			Media	SD
	1	2	3		
Controllo	5,3	4,3	4,6	4,73	0,51
B. fragilis WT	7,0	6,3	5,7	6,33	0,65
B. fragilis ΔPSA	5,3	5,0	4,6	4,97	0,35
B. henselae	6,1	7,2	6,1	6,47	0,64
B. fragilis WT + B. henselae	7,4	7,5	9,7	8,20	1,30
B. fragilis ΔPSA + B. henselae	6,6	6,0	7,0	6,53	0,50

Tabella 7.2: Percentuale di EPC in aliquote di 100μL di sangue conteggiate al FACS.

I dati ottenuti risultano significativi al test ANOVA per $p\text{-value} < 0,01$ e il valore medio di ogni trattamento, fatta eccezione per il numero di EPC infettate da *B. fragilis* Δ PSA, risulta essere significativo rispetto a quello del gruppo controllo mediante post hoc T-test rispettivamente per $*p < 0,05$. Il valore medio di EPC controllo è stato considerato del 100% e gli altri valori medi rapportati ad esso ottenendo il grafico seguente:

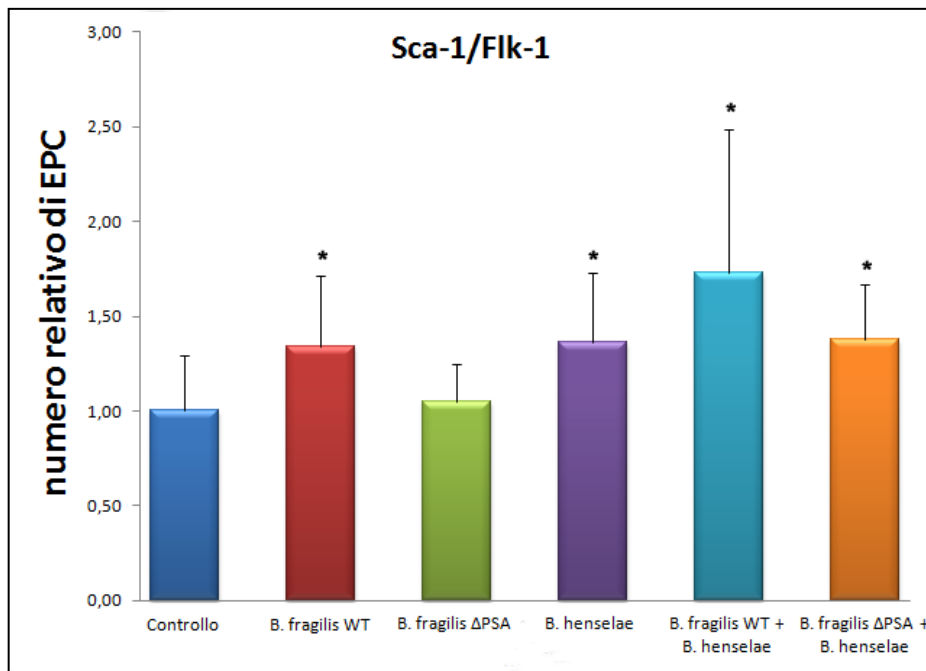


Grafico 7.2: Numero relativo medio di EPC in topi SCID infetti rispetto ai topi SCID di controllo misurato mediante analisi FACS. Cellule doppie positive a *Sca-1/Flk-1* sono considerate come EPC murine. Le barre indicano gli errori standard. ANOVA $p < 0,01$; post-hoc T-test $*p < 0,05$.

7.1.2 Immunofluorescenza

Per valutare se, sia *B. fragilis* WT che il ceppo mutante Δ PSA, fossero capaci di aderire ed invadere le cellule progenitrici endoteliali (EPC), si sono infettate EPC umane coltivate *in vitro* con entrambi questi ceppi batterici ad una molteplicità di infezione (MOI) di 100. Come controllo dell'infezione si sono usate EPC infettate da *B. henselae* a MOI 100, che presenta bassi effetti citostatici.

La presenza dei batteri è stata rivelata dopo 24h dall'infezione mediante microscopia confocale (fig. 7.1). L'immunofluorescenza con anticorpi specifici (Anti-lipopolisaccaridi di *B. fragilis* LPS, Santa Cruz Biotechnology, INC e Anti-*B. henselae*, Novus Biologicals) ha mostrato che sia *B. fragilis* WT che il suo mutante *B. fragilis* Δ PSA possono essere internalizzati nelle

EPC come precedentemente documentato per *B. henselae* (Salvatore P. et al., 2008). Tempi più lunghi di infezione (48h), nonché MOI superiori hanno mostrato risultati simili (fig. 7.2).

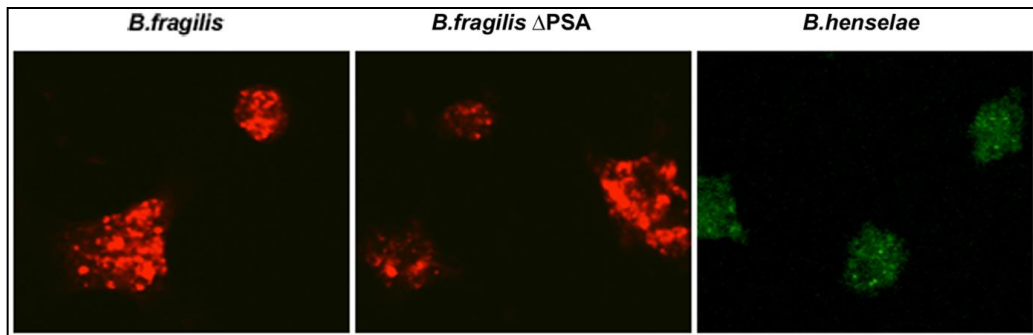


Figura 7.1: Immagini al confocale di EPC umane infette da *B. fragilis* WT, *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* a MOI 100. I batteri sono stati marcati con anticorpi specifici anti-LPS di *Bacteroides* (rosso) o con anti-Bartonella (verde) dopo 24 ore dall'infezione. Ingrandimento 100x.

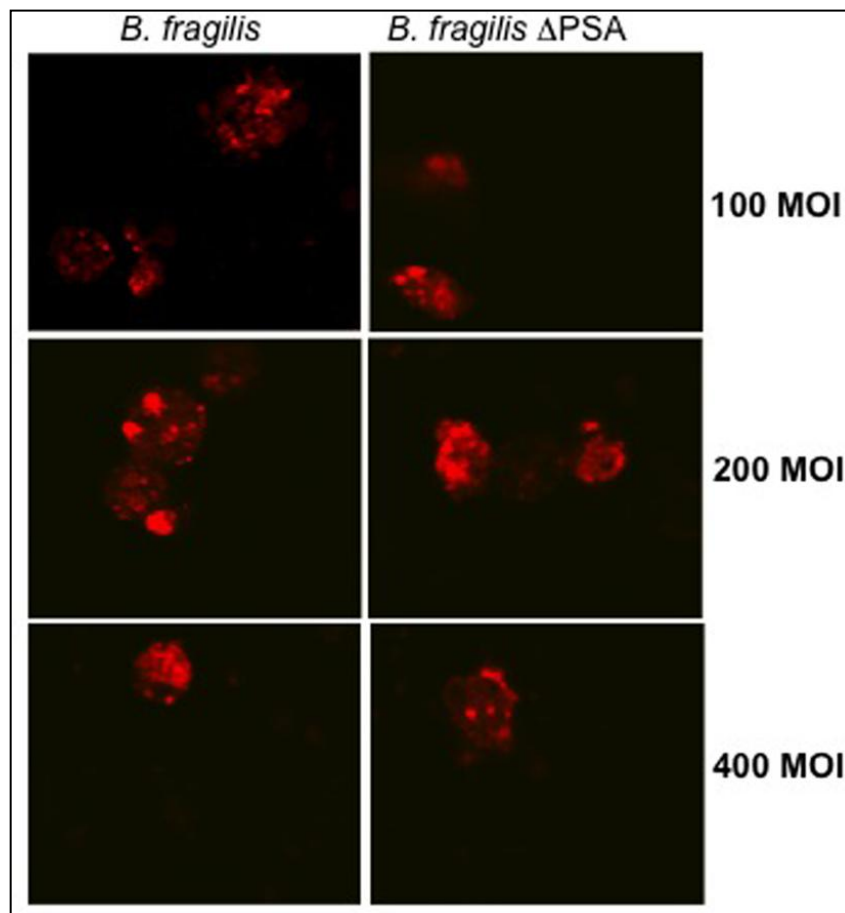


Figura 7.2: Immagini al confocale di EPC umane precoci, infettate con *B. fragilis* e *B. fragilis* Δ PSA a 100, 200 e 400 MOI. I batteri sono marcati con anticorpo specifico anti-LPS di *Bacteroides* (rosso) a 48 ore dall'infezione. Ingrandimento 100x.

Verificato che una MOI 100 era sufficiente affinché i ceppi di *B. fragilis* sia WT che Δ PSA siano internalizzati dalle EPC, negli esperimenti seguenti si è sempre utilizzata tale MOI.

Per quanto riguarda le co-infezioni (fig. 7.3), è interessante notare come nella co-infezione con *B. fragilis* WT si osserva nelle cellule prevalentemente la presenza del *Bacteroides* mentre, nella co-infezione con *B. fragilis* Δ PSA la presenza di *B. henselae* è più evidente (fig. 7.3). Le cellule sono state osservate dopo 24h, 48h e 72h (fig. 7.4) e con il passare del tempo la presenza del *B. fragilis* WT diminuisce a favore della *B. henselae*.

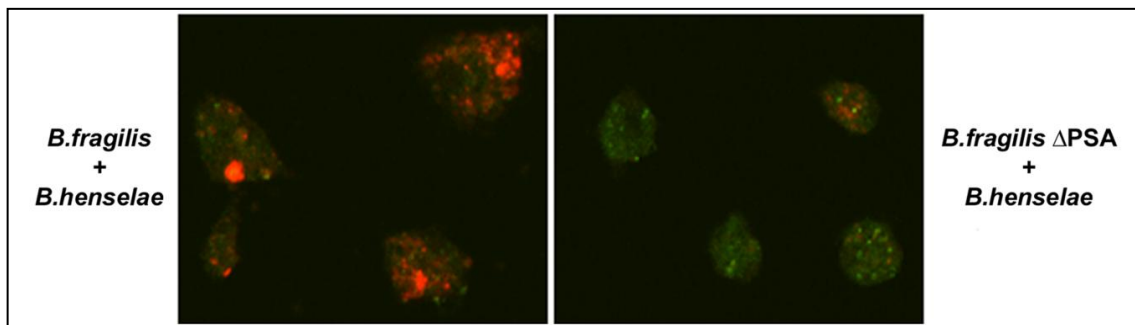


Figura 7.3: Immagini al confocale di EPC umane co-infettate da *B. fragilis* WT e *B. henselae* o *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*. Una MOI di 100 è stata utilizzata per tutti i ceppi batterici. Le cellule sono state marcate con anticorpi specifici anti-*Bacteroides* (rosso) e anti-*Bartonella* (verde) dopo 24 ore dall'infezione. Ingrandimento 100x.

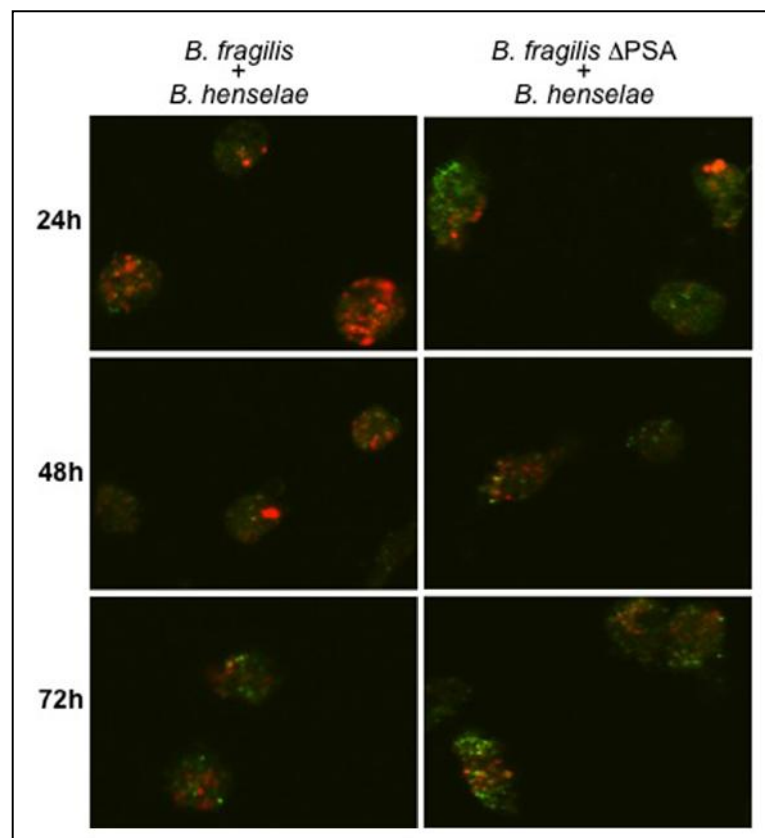


Figura 7.4: Immagini al confocale di EPC umane co-infettate da *B. fragilis* WT e *B. henselae* o *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*. Una MOI di 100 è stata utilizzata per tutti i ceppi batterici. Le cellule sono state marcate con anticorpi specifici anti-*Bacteroides* (rosso) e anti-*Bartonella* (verde) dopo 24, 48 e 72 ore dall'infezione. Ingrandimento 100x.

7.1.3 Analisi ultrastrutturale

Per confermare i dati di immunofluorescenza sono state osservate al TEM colture cellulari di EPC umane infettate singolarmente da *B. fragilis* WT, *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* o co-infettate da *B. fragilis* WT e *B. henselae* e da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* a 48 ore.

Inizialmente sono stati analizzati ultrastrutturalmente i singoli ceppi batterici utilizzati. *B. fragilis* WT (fig. 7.5A) presenta dimensioni medie di $\sim 1,00 \times 0,40 \mu\text{m}$ ed è regolarmente costituito da una parete batterica in cui la membrana più esterna è più voluminosa e circondata da una capsula da cui vengono rilasciate vescicole. Il batterio risulta presentare al suo interno ribosomi e corpi inclusi. *B. fragilis* Δ PSA (fig. 7.5B) non si presenta ultrastrutturalmente differente dalla sua forma selvatica. *B. henselae* (fig. 7.5C), infine, ha dimensioni medie di $\sim 0,40 \times 0,15 \mu\text{m}$ e risulta costituita regolarmente da una doppia membrana di cui quella esterna distanziata da quella interna è circondata da uno strato di adesine. E' un bacillo con morfologia esterna più irregolare di quella del *B. fragilis* e differentemente da questo non presenta la capsula.

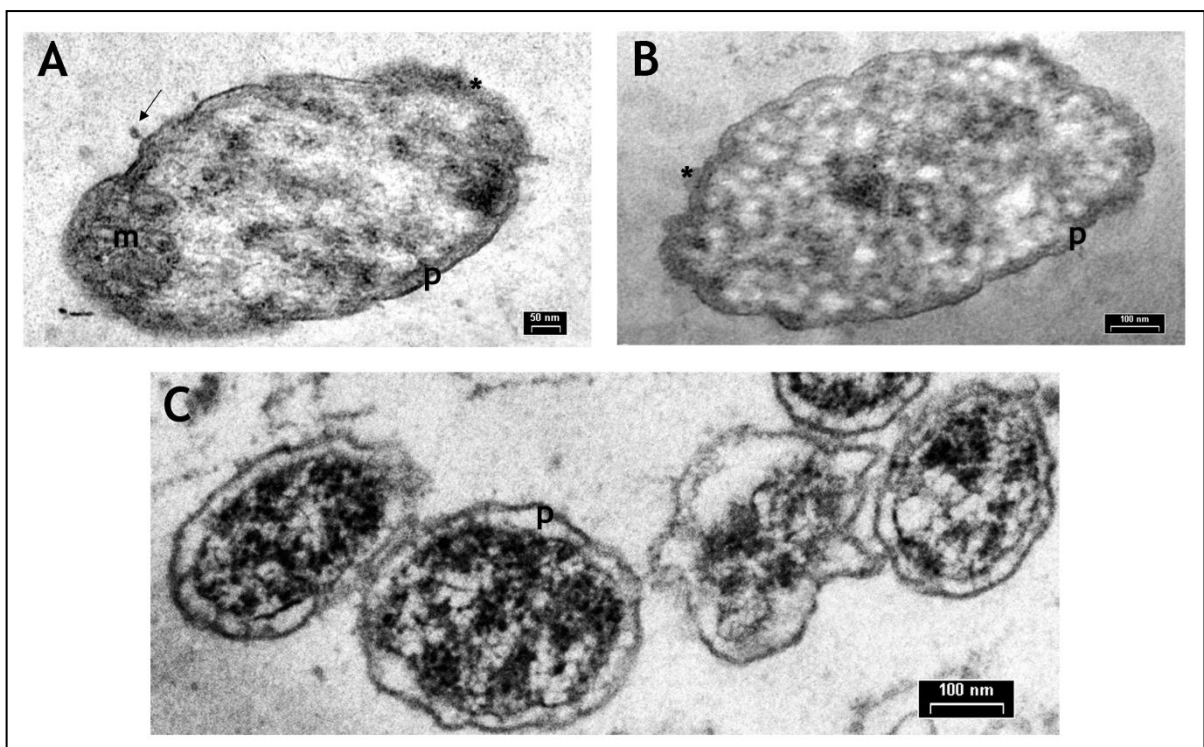


Figura 7.5: Micrografie al TEM. **(A)** *B. fragilis* WT con caratteristica forma bacillare, parete cellulare (p) circondata da capsula (*) e rilascio di vescicole all'esterno (freccia). All'interno si nota il mesosoma (m); **(B)** *B. fragilis* Δ PSA con tipica forma bacillare e parete (p) con all'esterno la capsula batterica (*); **(C)** *B. henselae* di forma bacillare con parete (p) costituita da una doppia membrana ma priva di capsula esterna.

Dalle micrografie sulle colture cellulari è emerso che *B. fragilis* sia WT (fig. 7.6B) sia Δ PSA (fig. 7.6C-D) riesce ad essere internalizzato dalle EPC dove viene digerito all'interno dei lisosomi che attiva. Le cellule infettate con *B. henselae* (fig. 7.6E-F) presentano sia la formazione di invasomi sia l'internalizzazione singola del batterio.

Nelle co-infezioni con il *B. fragilis* WT e *B. henselae* (fig. 7.7A-B), all'interno delle EPC sono stati ritrovati entrambi i batteri anche se le bartonelle sembrano internalizzare prevalentemente come singoli batteri piuttosto che come aggregati. Situazione differente è stata riscontrata nelle cellule co-infettate da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* (fig. 7.7C-D), in questo caso le bartonelle sono presenti prevalentemente all'interno di invasomi.

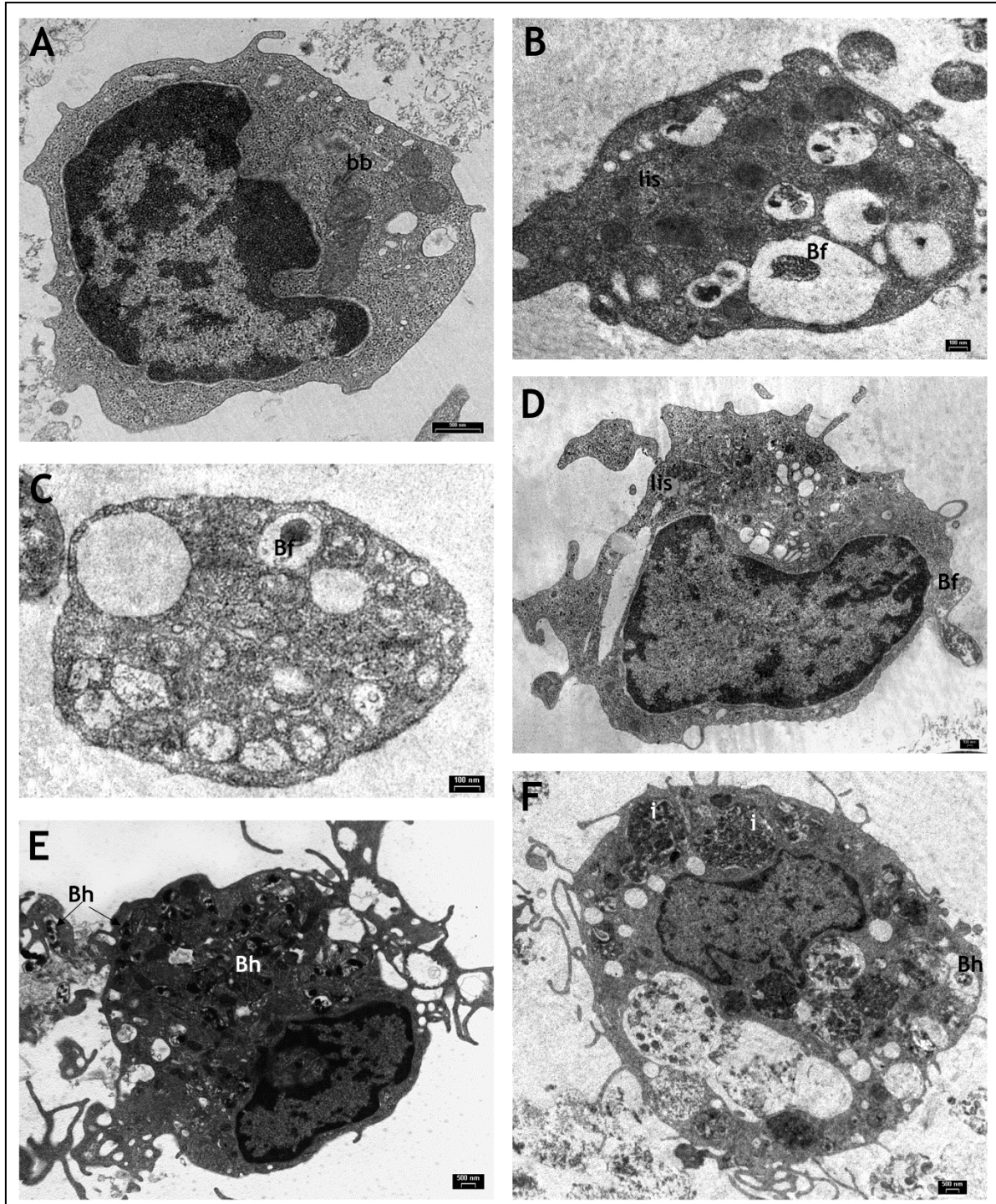


Figura 7.6: Micrografie al TEM di EPC umane **(A)** controllo, **(B)** infettate da *B. fragilis* WT, **(C-D)** infettate da *B. fragilis* Δ PSA, **(E-F)** infettate da *B. henselae*; **(A)** si notano nucleo con eterocromatina periferica, protrusioni della membrana plasmatica e la presenza di un basal body (bb); **(B)** batteri (bf) all'interno di vacuoli citoplasmatici e presenza di lisosomi attivi (lis); **(C)** presenza di un bacteroides all'interno di un vacuolo citoplasmatico; **(D)** si nota l'interazione tra il *B. fragilis* Δ PSA (Bf) e la membrana plasmatica e la presenza di lisosomi attivi (lis); **(E-F)** internalizzazione massiva di *B. henselae* sia singole all'interno di vacuoli (Bh) sia come aggregati in invasomi (i).

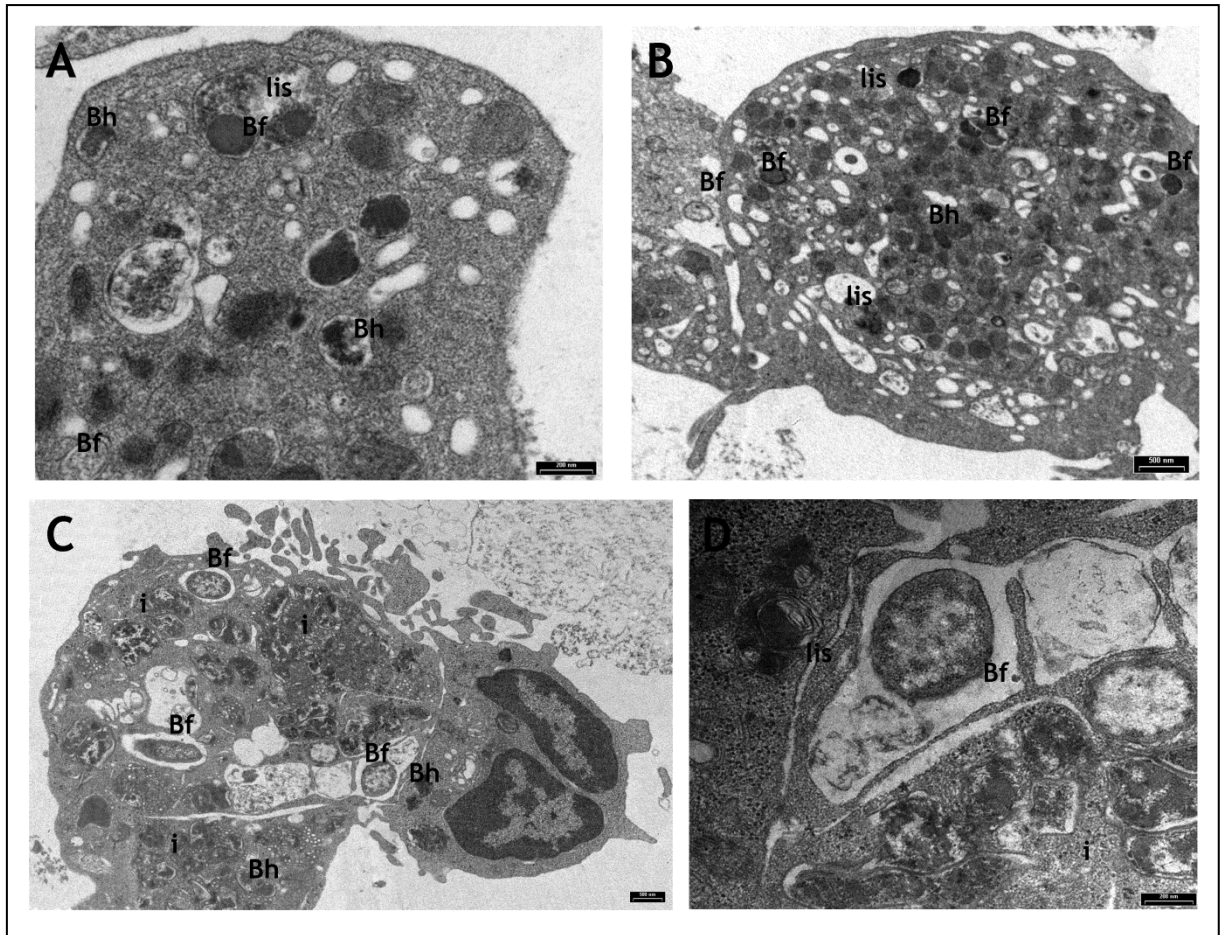


Figura 7.7: Micrografie al TEM di EPC umane **(A-B)** co-infettate da *B. fragilis* WT e *B. henselae*, **(C-D)** co-infettate da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*; **(A-B)** si nota la presenza sia di *B. fragilis* WT (Bf), all'interno di vacuoli citoplasmatici e all'interno di lisosomi (lis), sia quella di *B. henselae* (Bh) internalizzate singolarmente; **(C-D)** sono presenti sia *B. fragilis* Δ PSA (Bf) internalizzati in vacuoli citoplasmatici e all'interno di lisosomi (lis), sia di *B. henselae* (Bh) per lo piú aggregate a formare invasomi (i).

7.1.4 Analisi molecolare di chemochine e citochine infiammatorie

E' stata valutata la variazioni di espressione genica che si verifica nelle EPC in coltura in tutti i trattamenti considerati finora usando l'RT2 Profiler Array PCR e visualizzando contemporaneamente il profilo di 84 principali geni infiammatori codificanti chemochine, citochine e i loro recettori (fig. 7.8).

In entrambe le co-infezioni sia con *B. fragilis* WT e *B. henselae* che con *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* rispetto alla semplice infezione con *B. henselae* si è registrato un aumento del numero di geni differenzialmente espressi (DE) rispetto alle cellule non infette. In particolare, il confronto diretto dei livelli di espressione nei campioni co-infettati ha rivelato che *B. fragilis* WT esercita una significativa down-regolazione di chemochine pro-

infiammatorie (fig. 7.9) fornendo contemporaneamente una positiva modulazione di geni anti-infiammatori come IL-10 e Interferone-alfa 2 (IFNA2) (fig. 7.10).

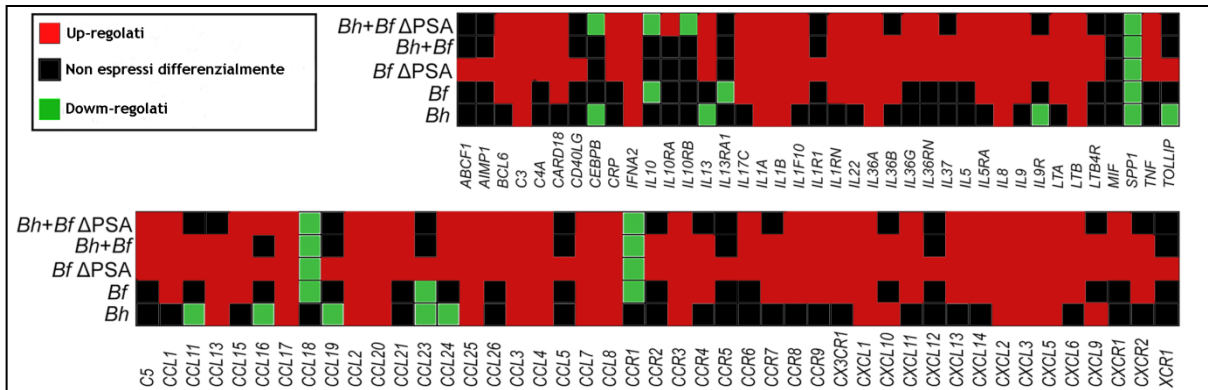


Figura 7.8: Livelli di espressione di 84 geni infiammatori in EPC umane infettate con *B. henselae*, *B. fragilis* WT, *B. fragilis* ΔPSA, *B. fragilis*Wt e *B. henselae* e *B. fragilis* ΔPSA e *B. henselae*. Dati di espressione differenziale sono valutati vs EPC non infettate.

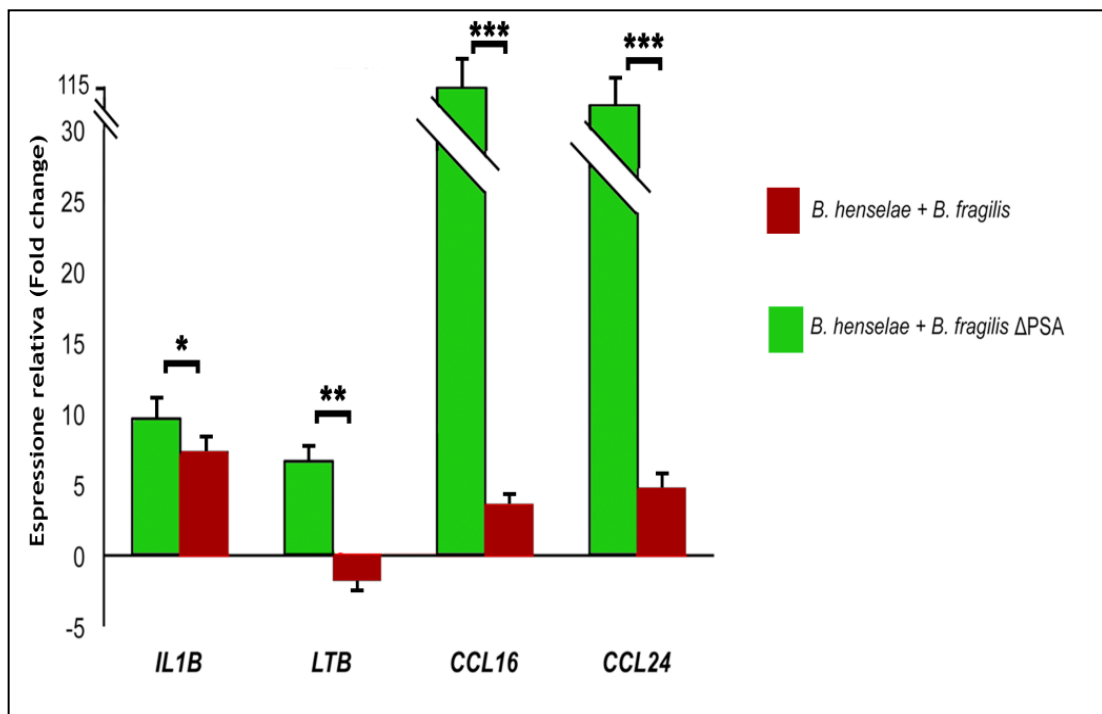


Figura 7.9: Livelli di espressione di geni pro-infiammatori altamente rappresentativi, differenzialmente espressi durante la co-infezione in EPC umane, in presenza e in assenza di PSA. (media ±SD, n=3; T-test *B. fragilis* WT + *B. henselae* vs *B. fragilis* ΔPSA + *B. henselae*: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

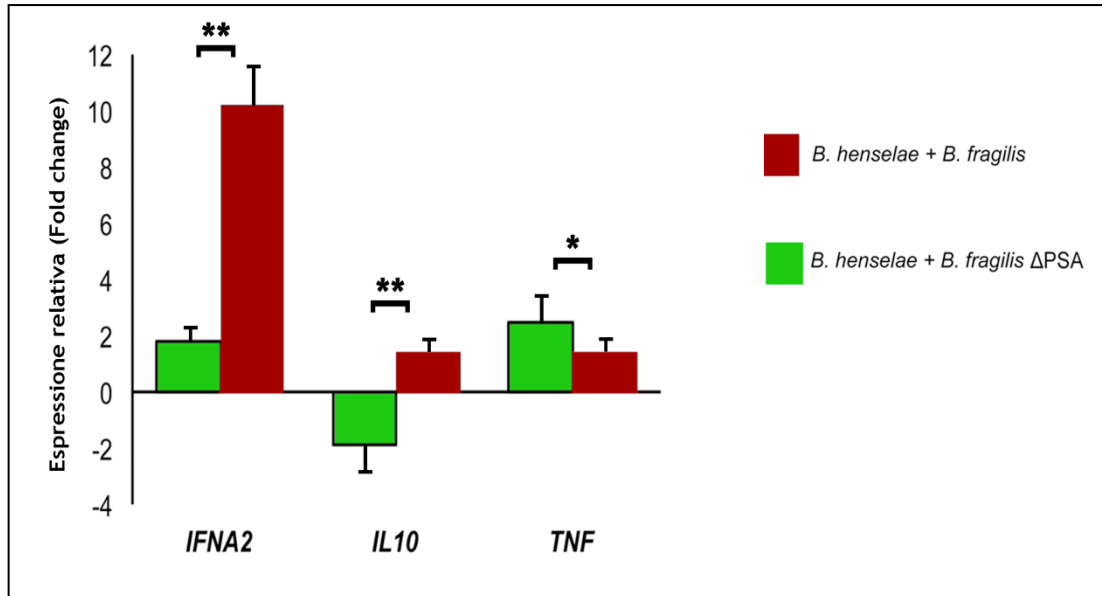


Figura 7.10: Livelli di espressione di geni anti-infiammatori altamente rappresentativi, differenzialmente espressi durante la co-infezione in EPC umane, in presenza e in assenza di PSA. (media \pm SD, n=3; T-test *B. fragilis* WT + *B. henselae* vs *B. fragilis* Δ PSA + *B. henselae*: * p <0,01; ** p <0,001).

7.1.5 Quantificazione di chemochine e citochine infiammatorie secrete

La secrezione delle principali citochine coinvolte nella risposta infiammatoria è stata valutata tramite test immunoenzimatico enzyme-linked (ELISA) sui surnatanti delle EPC umane sia non infette che infettate dalla sola *B. henselae* o co-infettate da *B. fragilis* WT e *B. henselae* o *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*.

In particolare, nei campioni co-infettati il ceppo di *B. fragilis* WT esercita una significativa sotto modulazione di interleuchine pro-infiammatorie (fig 7.11) in particolare dell'IL-17 e, al contrario, un incremento positivo di IL-10 (fig 7.12) rispetto ai campioni infettati dalla sola *B. henselae* fatta eccezione per l'IFN γ (fig 7.11).

Sia i campioni co-infettati con *B. fragilis* WT che con il suo ceppo mutante Δ PSA incrementano in maniera significativa le citochine anti-infiammatorie TNF α e il fattore stimolante le colonie granulocitiche macrofagiche (GM-CSF) rispetto ai campioni infettati con sola *B. henselae* (fig. 7.12).

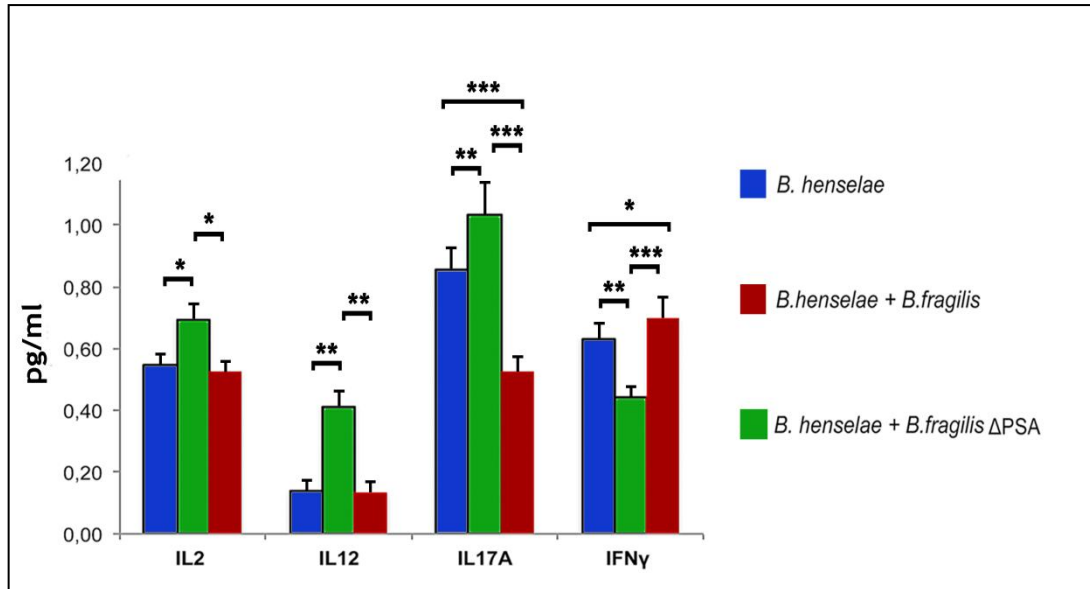


Figura 7.11: Quantificazione assoluta di proteine pro-infiammatorie secrete da EPC umane a 48 ore di infezione rispettivamente con *B. henselae*, o co-infettate con *B. fragilis* WT e *B. henselae* o co-infettate con *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*, rilevate tramite ELISA. (media \pm SD, n=6; T-test *B. fragilis* WT + *B. henselae* vs *B. henselae*; *B. fragilis* Δ PSA + *B. henselae* vs *B. henselae*; *B. fragilis* WT + *B. henselae* vs *B. fragilis* Δ PSA + *B. henselae*: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

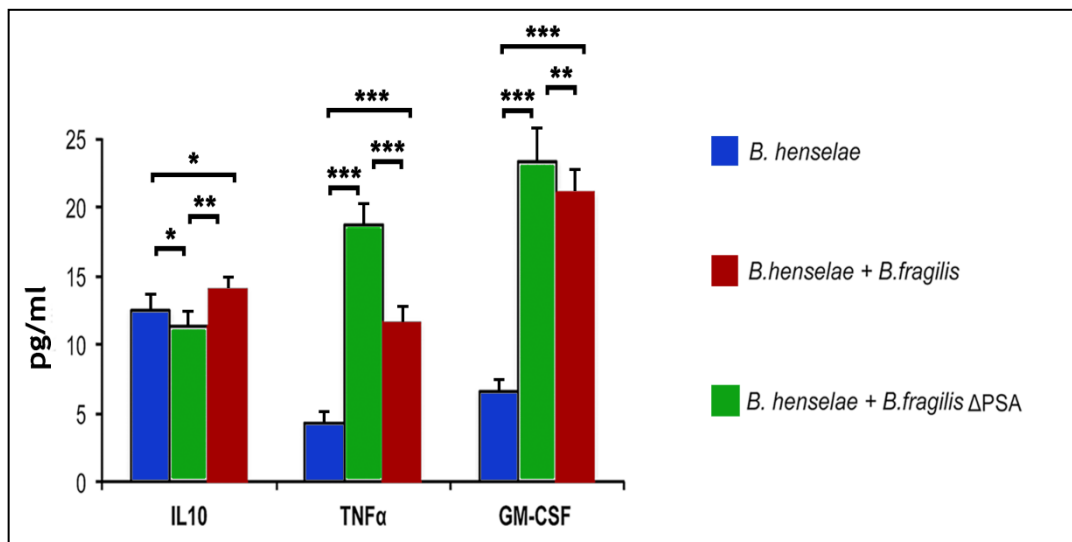


Figura 7.12: Quantificazione assoluta di proteine anti-infiammatorie secrete da EPC umane a 48 ore di infezione rispettivamente con *B. henselae*, o co-infettate con *B. fragilis* WT e *B. henselae* o co-infettate con *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*, rilevate tramite ELISA. (media \pm SD, n=6; T-test *B. fragilis* WT + *B. henselae* vs *B. henselae*; *B. fragilis* Δ PSA + *B. henselae* vs *B. henselae*; *B. fragilis* WT + *B. henselae* vs *B. fragilis* Δ PSA + *B. henselae*: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

CAPITOLO 8

Discussioni e conclusione

8.1 Evidenze del ruolo del PSA in *Mus musculus*

A oggi il ruolo protettivo del *polisaccaride A* espresso da *Bacteroides fragilis*, è stato studiato nei confronti dello stato infiammatorio intestinale conseguente all'infezione da *Helicobacter hepaticus* (Mazmanian S.K. et al., 2008). In questo lavoro si è ricercato se tale ruolo protettivo potesse essere ampliato anche ad altre infiammazioni croniche, derivanti da altre infezioni batteriche e in particolare da quella indotta da *Bartonella henselae*.

Le indagini morfologiche e ultrastrutturali evidenziando da una parte la presenza nei topi infettati con la sola *B. henselae*, sia di granulomi nel fegato che di cellule del sistema immunitario nell'avventizia dell'aorta, dall'altra l'assenza nei topi co-infettati con *B. fragilis WT* di risposta infiammatoria marcata, danno conferma dell'effetto protettivo svolto dalla molecola di PSA del *Bacteroides*. Questo effetto è anche supportato da una risposta infiammatoria più debole nei topi co-infettati con *B. fragilis ΔPSA*. Ciò suggerisce che anche altre molecole potrebbero essere coinvolte nel processo di immunoregolazione ed esercitare un effetto protettivo.

La risposta immunitaria osservata è sicuramente dovuta all'infezione da *B. henselae* ed è da escludere che sia dovuta al *B. fragilis*, in quanto l'indagine morfologica dei campioni infettati dal solo *B. fragilis WT* o *B. fragilis ΔPSA* mostra il regolare mantenimento dell'architettura del tessuto epatico e la mancanza di granulomi.

In accordo con quanto già evidenziato da Regnath T. et al. nel 1998 e come confermato dalla nested PCR, essendo passati 36 giorni dall'infezione, in tutti i topi non è stata riscontrata la presenza massiva di batteri, né di invasomi ma singoli batteri sono visibili solo a livello dello spazio di Disse o nel tessuto connettivo a livello dei granulomi. Ciò dimostra che il sistema immunitario dei topi immunocompetenti è in grado di riconoscere ed eliminare l'infezione batterica.

Nonostante un precedente lavoro (Richard J.F. et al., 1999) abbia dimostrato che le tossine di *B. fragilis* modificano il citoscheletro di actina inducendo rottura di giunzioni intercellulari

e che anche il processo di invasione di *B. henselae* sia actina-dipendente (Kyme P.A. et al., 2005), dalle nostre indagini si riscontrano giunzioni cellulari perfettamente disposte tra le cellule del fegato. Questo risultato indirettamente dimostra l'incapacità di questi batteri di invadere gli epatociti.

Il rigonfiamento degli endotelociti nell'aorta di topi infettati da *B. henselae* o dei topi co-infettati sia con *B. fragilis* WT che con *B. fragilis* Δ PSA è indice del soggiorno del batterio nella cellula che la utilizza come sua nicchia primaria (Dehio C., 2005).

La presenza di macrofagi oltre che di quella fisiologica delle cellule di Kupffer nel fegato dei topi che sono stati infettati da *B. fragilis* WT, dimostra che il PSA stimola anche il rilascio di citochine che favoriscono il reclutamento dei monociti dal circolo sanguigno.

8.2 Evidenze del ruolo del PSA in topi SCID

Le indagini morfologiche e ultrastrutturali eseguite sui topi SCID sottoposti agli stessi trattamenti dei topi immunocompetenti hanno evidenziato che tali topi tollerano l'infezione da *B. henselae* ad elevate concentrazioni. Tolleranza in netto contrasto con quanto ci si aspetterebbe durante una batteriemia con altri patogeni Gram-negativi dove la morte segue rapidamente l'infezione senza una rapida terapia antibiotica.

L'organismo ospite, ovvero il topo SCID, risponde all'infezione da *B. henselae* con una notevole deposizione di collagene nella regione circostante la vena centrolobulare e maggiormente nella regione portale del fegato, caratteristica questa riscontrata anche in patologie umane quali la peliosi epatica e l'angiomasiosi bacillare (Cockerell C.J. et al., 1991; Borczuk A.C. et al., 1998). Tale risposta permette all'organismo di contenere i batteri anche se offre agli stessi un ambiente protetto dove evitare la digestione da parte della risposta immunitaria.

La deposizione del collagene sembra essere dovuta non solo ai fibroblasti portalari ma anche alla massiccia presenza di cellule stellate attive che perdono le loro caratteristiche gocce citoplasmatiche contenenti retinoidi (Friedman S.L. et al., 1985). Queste cellule presentano infatti sulla loro membrana recettori TLR2 e TLR4 che sono in grado di riconoscere e rispondere a vari pattern molecolari associati a patogeni (PAMP) (Brun P. et al., 2005), per

cui potrebbero aver riconosciuto *B. henselae* ed essersi attivate. In particolare la via attivata tramite legame al TLR4 porta al rilascio di molecole essenziali per il reclutamento delle cellule di Kupffer e di altre cellule immunitarie (Paik Y.H. et al., 2006). Inoltre il TGF- β che deriva da fonti paracrine e autocrine, stimola la produzione non solo di collagene di tipo I ma anche di fibronectina e proteoglicani portando ad un aumento di fibrosi epatica (George J. et al., 2000) che non si ha solo per l'aumento delle cellule stellate ma anche per l'aumento di produzione di matrice extracellulare da parte di ogni singola cellula stellata attivata (Inagaki Y. & Okazaki I., 2007).

Le stesse alterazioni a livello delle cellule endoteliali riscontrate nei campioni sia di fegato che di aorta infettati dalla sola *B. henselae* o co-infettati con *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* possono essere dovute all'infezione da parte del batterio in quanto è noto che *B. henselae* infetta cellule endoteliali (Dehio C. et al., 1997) e può stimolarne la proliferazione (McCord A.M. et al., 2007). Inoltre quando si ha danno a cellule endoteliali, queste rilasciano fibronectina cellulare che risulta essere un ulteriore stimolo per l'attivazione delle cellule stellate epatiche (Jarnagin W.R. et al., 1994).

Nei campioni infettati da *B. fragilis* WT si nota però la riduzione nella produzione di collagene e una maggiore risposta da parte dei macrofagi ciò induce quindi a pensare che in condizione di immunocompromissione, il PSA possa stimolare la proliferazione e attivazione di cellule dell'immunità innata riuscendo a contenere i danni indotti dall'infezione da *B. henselae* nel caso della co-infezione ma dando una lieve flogosi in quelli infettati dal solo *B. fragilis* WT. Questa però può essere una condizione dovuta all'eccessiva concentrazione di *B. fragilis* somministrata ai topi per via orale dal momento che anche nei topi infettati dal solo *B. fragilis* Δ PSA si ha produzione di collagene e quindi una risposta dell'organismo o anche al numero ridotto di cellule NK che è risaputo portare le cellule stellate all'apoptosi riducendone l'attività fibrotica (Melhem A. et al., 2006).

8.3 Evidenze del ruolo del PSA sulle EPC

Nei topi immunocompetenti infettati da *B. henselae* il numero di EPC diminuisce drasticamente di circa il 90% rispetto al numero di EPC dei topi controllo. Dato previsto sulla

base di un precedente lavoro (Costa V. et al., 2010) dove vengono considerati i danni indotti da *B. henselae* sulle EPC di soggetti affetti da sindrome di Down. Le bartonelle, infatti, si aggregano tra loro all'esterno della cellula e la infettano formando invasomi, all'interno dei quali continuano il loro ciclo vitale, duplicandosi continuamente, fino a determinare lo scoppio della cellula.

Sorprendentemente il numero di EPC però aumenta nei campioni infettati da *B. fragilis* WT ma non nei campioni infettati da *B. fragilis* Δ PSA dove si registra una leggera diminuzione. Anche nelle co-infezioni con *B. fragilis* WT non si registra una drastica diminuzione delle EPC. Ciò indica che il PSA è in grado di contrastare la diminuzione di EPC indotte dall'infezione da *B. henselae*.

Nei topi immunocompromessi, si evidenzia sorprendentemente un aumento nel numero di EPC nei campioni infettati da *B. henselae* rispetto ai controlli. Inoltre rispetto ai controlli non si ha variazione in numero nei campioni infettati da *B. fragilis* Δ PSA così come l'aumento nei campioni co-infettati con *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* è identico a quello registrato nella sola infezione con *B. henselae* dato questo che indica la non risposta delle EPC al *B. fragilis* Δ PSA. Un aumento si ha anche in questo caso nei campioni infettati con *B. fragilis* WT e ancora di più in quelli co-infettati con *B. fragilis* WT e *B. henselae*.

L'aumento del numero di EPC in risposta all'infezione e alla co-infezione con *B. fragilis* WT sia nei topi immunocompetenti che in quelli immunocompromessi può essere dovuto al fatto che le EPC nel loro stadio differenziativo precoce mantengono caratteristiche simili ai monociti (Medina R.J. et al., 2010), avendo un precursore comune, per cui potrebbe essere stimolata la loro proliferazione in risposta al PSA proprio come evidenziato anche nel caso dei macrofagi.

Particolare invece è l'aumento di EPC in risposta all'infezione da *B. henselae* nei topi immunocompromessi. Ciò può essere dovuto o a un ulteriore meccanismo di difesa che l'organismo attua tenendo presente la natura macrofagica delle early EPC, oppure considerando che in soggetti immunocompromessi *B. henselae* è il maggiore responsabile dell'angiomatosi bacillare. L'angiomatosi bacillare è una malattia in cui si formano lesioni principalmente a livello della cute, dei linfonodi e di organi principali quali fegato e milza, seguite da vasoproliferazione dei capillari necessari a irrorare tali aree lesionali e tale processo potrebbe richiedere un maggiore apporto di precursori endoteliali.

L'immunofluorescenza con anticorpi specifici mostra che sia *B. fragilis* WT che il suo mutante Δ PSA possono essere internalizzati dalle EPC come precedentemente documentato per *B. henselae* (Salvatore P. et al., 2008). Tempi più lunghi di infezione (48h e 72h), nonché MOI superiori hanno mostrato risultati simili. Ciò dimostra che *B. fragilis* è in grado di essere internalizzato nelle EPC e che tale processo è indipendente dal PSA.

Negli esperimenti *in vitro* di co-infezione su EPC umane in coltura si nota che nella co-infezione con *B. fragilis* WT si osserva una prevalenza di *Bacteroides* mentre, nella co-infezione con *B. fragilis* Δ PSA la presenza di *Bartonella henselae* era più evidente. Questi risultati suggeriscono che *B. fragilis* WT, ma non *B. fragilis* Δ PSA, contrasta l'internalizzazione di *B. henselae*.

I dati di immunofluorescenza sono stati confermati anche dalle osservazioni al TEM. Dalle micrografie è emerso che *B. fragilis* sia WT che Δ PSA riescono a internalizzare nelle EPC ma vengono anche digeriti all'interno dei lisosomi, inoltre nelle co-infezioni con il *B. fragilis* WT, si osserva un numero ridotto di invasori rispetto alle cellule infettate dalla sola *B. henselae*, o co-infettate con *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae* come se il batterio avesse difficoltà a duplicarsi all'interno di queste cellule. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che *B. fragilis* è in grado di rilasciare una batteriocina, ovvero una sostanza chimica antibatterica a cui esso stesso è resistente, ma che rappresenta molto probabilmente un meccanismo con il quale riduce la competizione con gli altri ceppi batterici che occupano la sua stessa nicchia ecologica (Avelar K.E. et al., 1999) proprio come nel nostro caso la *B. henselae*. Possiamo ipotizzare che il suo mutante Δ PSA non produca batteriocine o più probabilmente che il PSA stimoli le caratteristiche macrofagiche delle EPC che quindi si mostrano più resistenti al batterio.

Condizione questa confermata valutando i livelli di espressione genica nei campioni di EPC co-infettate rispetto alle EPC infettate dalla sola *B. henselae*, che hanno rivelato che *B. fragilis* WT esercita una significativa down-regolazione di chemochine pro-infiammatorie fornendo contemporaneamente una positiva modulazione di geni anti-infiammatori come IL-10 e Interferone-alfa 2 (IFNA2). Dato avvalorato da Cohen-Poradosu et al., 2011, che ha evidenziato il rilascio di IL-10 da parte dei macrofagi in seguito a stimolazione del PSA in condizione di ascesso intestinale.

Valutando le citochine e le chemochinescrete si osserva che nei campioni di EPC co-infettate con il ceppo di *B. fragilis* WT, questo esercita una significativa sotto modulazione di interleuchine pro-infiammatorie e, al contrario, un incremento positivo del TNF α e del fattore stimolante le colonie granulocitiche macrofagiche (GM-CSF) rispetto alle EPC infettate dalla sola *B. henselae* e soprattutto di IL-10 rispetto anche alle EPC co-infettate da *B. fragilis* Δ PSA e *B. henselae*. Questo dato conferma quindi ulteriormente che le early EPC possono svolgere un ruolo essenziale nella risposta immunitaria se stimulate dal PSA e soprattutto derivando queste dal precursore comune mieloide spiega perché il loro numero aumenta quando i topi sia immunocompetenti che immunocompromessi vengono infettati dal solo *B. fragilis* WT.

8.4 Conclusione

Possiamo quindi concludere che il PSA prodotto dal *B. fragilis* ha nei topi immunocompetenti un ruolo protettivo nei confronti dell'infiammazione cronica indotta da *B. henselae*. Tale molecola, quindi, esercita il suo ruolo anti-infiammatorio stimolando il rilascio di IL-10 da parte di cellule T non solo a livello intestinale come finora già dimostrato ma anche a livello sistemico.

Il PSA stimola nei soggetti immunocompromessi la risposta immunitaria innata attivando e stimolando la proliferazione dei macrofagi. La risposta dei macrofagi e il rilascio di IL-10 che ne consegue apportano sicuramente miglioramenti alla fibrosi indotta da *B. henselae*. L'IL-10 infatti, che può essere prodotta anche dalle cellule stellate stesse, determina in quest'ultime la down-regolazione dell'espressione del collagene di tipo I svolgendo quindi attività antifibrotica (Wang S.C. et al., 1998). Dosi elevate di PSA potrebbero però stimolare una risposta immunitaria eccessiva da parte dell'organismo determinando flogosi.

Il PSA, infine, stimola la proliferazione di EPC le quali oltre ad avere un ruolo nella riendotelizzazione dei vasi lesi probabilmente possono anche assumere un ruolo nelle difese immunitarie. Questo è dovuto anche al fatto che l'IL-10 ha un ruolo angiogenico che aumenta il mantenimento e la disponibilità numerica di queste cellule a partecipare alla guarigione delle ferite (Krishnamurthy P. et al., 2011).

Nonostante ulteriori studi siano necessari per chiarire con precisione il meccanismo con il quale oltre alle cellule T anche i macrofagi vengono direttamente stimolati dal PSA, i primi

risultati ottenuti inducono a pensare che in virtù dell'induzione della sintesi dell'IL-10 data dal PSA, tale molecola possa iniziare ad essere utilizzata per trials clinici al fine di sviluppare innovative terapie nei confronti di malattie infiammatorie croniche.

In futuro, a tal fine, sarebbe inoltre opportuno, effettuare ulteriori indagini cellulari, molecolari e morfologiche utilizzando e testando direttamente la molecola purificata di PSA.

BIBLIOGRAFIA

- Aicher A., Heeschen C., Mildner-Rihm C., Urbich C., Ihling C., Technau-Ihling K., Dimmler S.** 2003. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 9:1370-1376.
- Arvand M., Ignatius R., Regnath T., Hahn H., Mielke M.E.** 2001. Bartonella henselae-specific cell-mediated immune responses display a predominantly Th1 phenotype in experimentally infected C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 69(10):6427-33.
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M.** 1997a. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275:964-7.
- Asahara T., Chen K.** 1997b. Circulating endothelial progenitor cells incorporate into reendothelialization after vascular injury. *Circulation*:99 suppl I:7251-7301
- Avelar K.E., Pinto L.J., Antunes L.C., Lobo L.A., Bastos M.C., Domingues R.M., Ferreira M.C.** 1999. Production of bacteriocin by *Bacteriodes fragilis* and partial characterization. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:264-268.
- Babu M.M., Priya M.L., Selvan A.T., Madera M., Gough J., Aravind L., Sankaran K.** 2006. A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J. Bacteriol.* 188:2761-2773.
- Baggio L., Morrision M.** 1996. The NAD(P)H-utilizing glutamate dehydrogenase of *Bacteroides thetaiotaomicron* belongs to enzyme family I, and its activity is affected by trans-acting gene(s) positioned downstream of *gdhA*. *J. Bacteriol.* 178:7212-7220.
- Bailey A.S., Jiang S., Afentoulis M., Baumann C.L., Schroeder D.A., Olson S.B., Wong M.H., Fleming W.H.** 2004. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood.* 103:13-19.
- Bahlmann F.H., De Groot K., Spandau J.M., Landry A.L., Hertel B., Duckert T., Boehm S.M., Menne J., Haller H., Fliser D.** 2004. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood.* 103(3):921-6.
- Batterman H.J., Peek J.A., Loutit J.S., Falkow S., Tompkins L.S.** 1995. Bartonella henselae and Bartonella quintana adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect. Immun.* 63:4553-4556.
- Bai Y., Kosoy M.Y., Ray C., Brinkerhoff R.J., Collinge S.K.** 2008. Temporal and spatial patterns of Bartonella infection in black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Microb. Ecol.* 56:373-382.

- Beltrami A.P., Cesselli D., Bergamin N., Marcon P., Rigo S., Puppato E., D'Aurizio F., Verardo R., Piazza S., Pignatelli A., Poz A., Baccarani U., Damiani D., Fanin R., Mariuzzi L., Finato N., Masolini P., Burelli S., Belluzzi O., Schneider C., Beltrami C.A.**. 2004. In the adult human heart resides a population of non-blood borne multipotent cardiac progenitor cells. *Circulation*. 110(suppl III):239.
- Benson L.A., Kar S., McLaughlin G., Ihler G.M.**. 1986. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect. Immun.* 54:347–353.
- Berg J.O., Lindqvist L., Nord C.E.**. 1980. Purification of glycohydrolases from *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:40–47.
- Billeter S.A., Diniz P.P., Battisti J.M., Munderloh U.G., Breitschwerdt E.B., Levy M. G.**. 2009. Infection and replication of *Bartonella* species within a tick cell line. *Exp. Appl. Acarol.* 49:193-208.
- Bloem K., García-Vallejo J.J., Vuist I.M., Cobb B.A., van Vliet S.J., van Kooyk Y.**. 2013. Interaction of the capsular polysaccharide A from *Bacteroides fragilis* with DC-SIGN on human dendritic cells is necessary for its processing and presentation to T cells. *Frontiers in immunology*. 4:103.
- Borczuk A.C., Niedt G., Sablay L.B., Kress Y., Mannion C.M., Factor S.M., Tanaka K.E.**. 1998. Fibrous long-spacing collagen in bacillary angiomatosis. *Ultrastruct. Pathol.* 22:127–133.
- Bosma M.J., Carroll A.M.**. 1991. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol.* 9:323-50.
- Bouvard C., Gafsou B., Dizier B., Galy-Fauroux I., Lokajczyk A., Boisson-Vidal C., Fischer A.M., Helley D.**. 2010. Alpha6-integrin subunit plays a major role in the proangiogenic properties of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:1569.
- Breitschwerdt E.B., Kordick D.L.**. 2000. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:428–438.
- Briguori C., Testa U., Riccioni R., Colombo A., Petrucci E., Condorelli G., Mariani G., D'Andrea D., De Micco F., Rivera N.V., Puca A.A., Peschle C., Condorelli G.**. 2010. Correlations between progression of coronary artery disease and circulating endothelial progenitor cells. *FASEB J.* 24:1981-1988.
- Brook I.** 2007. Treatment of anaerobic infection. *Expert Review of Anti Infective Therapy.* 5(6): 991–1006.
- Brun P., Castagliuolo I., Pinzani M., Palu G., Martines D.**. 2005. Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289:G571–G578.

- Buckles E.L., McGinnis Hill E.** 2000. Interaction of Bartonella bacilliformis with human erythrocyte membrane proteins. *Microb. Pathog.* 29:165–174.
- Caiado F., Real C., Carvalho T., Dias S.** 2008. Notch pathway modulation on bone marrow-derived vascular precursor cells regulates their angiogenic and wound healing potential. *PLoS One.* 3:e3752.
- Caldwell D.R., Arcand C.** 1974. Inorganic and metalorganic growth requirements of the genus Bacteroides. *J. Bacteriol.* 120:322–333.
- Callaghan M.J., Ceradini D.J., Gurtner G.C.** 2005. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species and impaired endothelial progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal.* 7:1476.
- Capo C., Amirayan-Chevillard N., Brouqui P., Raoult D., Mege JL.** 2003. Bartonella quintana bacteremia and overproduction of interleukin-10: model of bacterial persistence in homeless people. *J. Infect. Dis.* 187(5):837-44.
- Caspari D., Macy J.M.** 1983. The role of carbon dioxide in glucose metabolism of Bacteroides fragilis. *Arch. Microbiol.* 135:16–24.
- Cerdeno-Tarraga A.M., Patrick S., Crossman L.C., Blakely G., Abratt V., Lennard N., Poxton I., Duerden B., Harris B., Quail M.A., Barron A., Clark L., Corton C., Doggett J., Holden M.T., Larke N., Line A., Lord A., Norbertczak H., Ormond D., Price C., Rabbinowitsch E., Woodward J., Barrell B., Parkhill J.** 2005. Extensive DNA inversions in the B. fragilis genome control variable gene expression. *Science* 307:1463–1465.
- Chen Z., O’Shea J.J.** 2008. T_H17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol. Res.* 41:87.
- Chenoweth M.R., Somerville G.A., Krause D.C., O’Reilly K.L., Gherardini F.C.** 2004, Growth Characteristics of Bartonella henselae in a Novel Liquid Medium: Primary Isolation, Growth-Phase-Dependent Phage Induction, and Metabolic Studies. *Applied and Environmental Biology.* 70:656-663.
- Chiaraviglio L., Duong S., Brown D.A., Birtles R.J., Kirby J.E.** 2010. An Immunocompromised Murine Model of Chronic Bartonella Infection. *The American Journal of Pathology.* 176(6):2753-2763.
- Cho H., Balaji S., Sheikh A.Q., Hurley J.R., Tian Y.F., Collier J.H., Crombleholme T.M., Narmoneva D.A.** 2012. Regulation of endothelial cell activation and angiogenesis by injectable peptide nanofibers. *Acta Biomater.* 8:154.
- Choi J.H., Kim K.L., Huh E., Kim B., Byun J., Suh W., Sung J., Jeon E.S., Oh H.Y., Kim D.K.** 2004. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 24:1-9.

- Chomel B.B., Boulouis H.J., Breitschwerdt E.B., Kasten R.W., Vayssier-Taussat M., Birtles R.J., Koehler J.E., Dehio C.** 2009. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Veterinary Research* 40.
- Cobb B.A., Wang Q., Tzianabos A.O., Kasper D.L.** 2004. Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway. *Cell*. 117:677–687.
- Cobb B.A., Kasper D.L.** 2005. Zwitterionic capsular polysaccharides: the new MHCII-dependent antigens. *Cell Microbiol.* 7:1398–1403.
- Cobb B.A., Kasper D.L.** 2008. Characteristics of carbohydrate antigen binding to the presentation protein HLA-DR. *Glycobiology*. 18:707–718.
- Cockerell C.J., Tierno P.M., Friedman-Kien A.E., Kim K.S.** 1991. Clinical, histologic, microbiologic, and biochemical characterization of the causative agent of bacillary (epithelioid) angiomatosis: a rickettsial illness with features of bartonellosis. *J. Invest. Dermatol.* 97:812–817.
- Cohen-Poradosu R., McLoughlin R.M., Lee J.C., Kasper D.L.** 2011. *Bacteroides fragilis*-stimulated interleukin-10 contains expanding disease. *J Infect Dis*. 204:363–371.
- Costa V., Sommese L., Casamassimi A., Colicchio R., Angelini C., Marchesano V., Milone L., Farzati B., Giovane A., Fiorito C., Rienzo M., Picardi M., Avallone B., Corsi M.M., Sarubbi B., Calabrò R., Salvatore P., Ciccodicola A., Napoli C.** 2010. Impairment of circulating endothelial progenitors in Down syndrome. *BMC Med Genomics*. 13(3):40.
- Cozzani E., Cinotti E., Ameri P., Sofia A., Murialdo G., Parodi. A.** 2011. Onset of cutaneous vasculitis and exacerbation of IgA nephropathy after *Bartonella henselae* infection. *Clinical dermatology*. doi:10.1111/j.1365-2230.2011.04177.x
- Cyktor J.C., Turner J.** 2011. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infect Immun*. 79(8):2964-73.
- Dasgupta S., Ertuk-Hasdemir D., Ochoa-Reparaz J., Reinecker H.C., Kasper D.L.** 2014. Plasmacytoid dendritic cells mediate anti-inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. *Cell Host&Microbe*. 15(4): 413-423.
- de O. Ferreira E., Araujo Lobo L., Barreiros Petropolis D., dos K., Avelar S., Ferreira M.C., Costa e Silva Filho F., Domingues R.M.** 2006. A *Bacteroides fragilis* surface glycoprotein mediates the interaction between the bacterium and the extracellular matrix component laminin-1. *Res. Microbiol*. 157:960–966.
- Dehio C., Meyer M., Berger J., Schwarz H., Lanz C.** 1997. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *Journal of Cell Science*. 110:2141-2154.

- Dehio C.** 2001. Bartonella interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends in Microbiology*. 9(6):279-285.
- Dehio C.** 2005. Bartonella-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:621– 631.
- Deschryver-Kecskermeti K., Bancroft G.J., Bosma G.C., Bosma M.J.** 1985. Severe combined immunodeficiency in the mouse: pathology, reconstitution, neoplasms. *Am. J. Pathol.* 120:464-477.
- Duan J., Avci F.Y., Kasper D.L.** 2008. Microbial carbohydrate depolymerization by antigen-presenting cells: Deamination prior to presentation by the MHCII pathway. *PNAS.* 105:5183.
- Fabbi M., De Giuli L., Martinello F., Bragoni R., Magnino S., Mersi S.** 2000. La malattia da graffio del gatto: una nuova zoonosi emergente. *L'osservatorio.* 3(5).
- Fabbi M., Marone P., Zavanella M.** 2005, Bartonella henselae, agente eziologico di una zoonosi emergente: la malattia da graffio del gatto. *Progresso Vet.* 4:155-157.
- Facer C.A.** 1983. Merozoites of *P. falciparum* require glycophorin for invasion into red cells. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.* 76:463– 469.
- Foil L., Andress E., Freeland R.L., Roy A.F., Rutledge R., Triche P.C., O'Reilly K.L.** 1998. Experimental infection of domestic cats with Bartonella henselae by inoculation of Ctenocephalides felis (Siphonaptera: Pulicidae) feces. *J Med Entomol.* 35:625–628.
- Friedman S.L., Roll F.J., Boyles J., Bissell D.M.** 1985. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:8681–8685.
- Fujiwara T., Uehara T.** 1982. Scanning electron microscopical study of vascular smooth muscle cells in mesenteric vessels of the monkey. *Biomed. Res.* 3:649.
- George J., Wang S.S., Sevcsik A.M., Sanicola M., Cate R.L., Koteliansky V.E., Bissell D.M.** 2000. Transforming growth factor-beta initiates wound repair in rat liver through induction of the EIIIA-fibronectin splice isoform. *Am J Pathol.* 156:115–124.
- Gonzalez-Fernandez A., Faro J., Fernandez C.** 2008. Immune responses to polysaccharides: lessons from humans and mice. *Vaccine.* 26:292.
- Gibson S.A., Macfarlane G.T.** 1988. Characterization of proteases formed by *Bacteroides fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2231–2240.

- Gill M., Dia S., Hattori K., Rivera M.L., Hicklin D., Witte L., Girardi L., Yurt R., Himel H., Rafii S.** 2001. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2+AC133+ endothelial precursor cells. *Circ Res.* 88:167-174.
- Greene C.E., McDermott M., Jameson P.H., Atkins C.L., Marks A.M.** 1996. Bartonella henselae infection in cats: evaluation during primary infection, treatment, and rechallenge infection. *J. Clin. Microbiol.* 34(7):1682-5.
- Handergritenger R., Gordon P.R., Kuci S.** 2003. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N/Y acad Sci.* 996:141-151.
- Harms A., Dehio C.** 2012. Intruders below the Radar: Molecular Pathogenesis of Bartonella spp. *Clinical Microbiology Reviews.* 25:42-78.
- Hattori K., Dias S., Hackett N.R., Lyden D., Tetano M., Hicklin D.J., Zhu Z., Witte L., Crystal R.G., Moore M.A., Rafii S.** 2001. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenesis and hematopoietic stem cells. *J Exp.* 193(9):1005-14.
- Hattori K., Heissing B., Wu Y., Dias S., Tejada R., Ferris B., Hicklin D.J., Zhu Z., Bohlen P., Witte L., Hendrikx J., Hackett N.R., Crystal R.G., Moore M.A., Werb Z., Lyden D., Rafii S.** 2002. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med.* 8:841-849
- Heijtz R.D., Wang S., Anuar F., Qian Y., Björkholm B., Samuelsson A., Hibberd M.L., Forssberg H., Pettersson S.** 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:3047–3052.
- Heissig B., Hattori K., Dias S., Friedrich M., Ferris B., Hackett N.R., Crystal R.G., Besmer P., Lyden D., Moore M.A., Werb Z., Rafii S.** 2002. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 109:625–637.
- Hill J.M., Zalos G., Halcox J.P., Schenke W.H., Waclawiw M.A., Quyyumi A.A., Finkel T.** 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 348: 593–600.
- Hristov M., Erl W., Weber P.C.** 2003. Endothelial Progenitor Cells Mobilization, Differentiation, and Homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1185-1189.
- Hynes R.O.** 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 326:1216.
- Huang K.Y.** 1967. Metabolic activity of the trench fever rickettsia, Rickettsia quintana. *J. Bacteriol.* 93:853–859.

- Inagaki Y., Okazaki I.** 2007. Emerging insights into transforming growth factor beta smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*. 56:284–292.
- Ishida Y., Kimura A., Kuninaka Y., Inui M., Matsushima K., Mukaida N., Kondo T.** 2012. Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J Clin Invest*. 122:711.
- Iwaki-Egawa S., Ihler G.M.** 1997. Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 157:207–217.
- Iwasaki A., Medzhitov R.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptative immune responses. *Nat. Immunol.* 5:987.
- Izcue A., Coombes J.L., Powrie F.** 2006. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev.* 212:256–271.
- Janeway C.A. Jr, Carding S., Jones B., Murray J., Portoles P., Rasmussen R., Rojo J., Saizawa K., West J., Bottomly K.** 1988. CD4⁺ T cells: specificity and function. *Immunol. Rev.* 101:39.
- Jarnagin W.R., Rockey D.C., Koteliansky V.E., Wang S.S., Bissell D.M.** 1994. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol.* 127:2037–2048.
- Jennings M., Batchelor G.R., Brain P.F., Dick A., Elliot H., Francis R.J., Hubrecht R.C., Hurst J.L., Morton D.B., Peters A.G., Raymond R., Sales G.D., Sherwin C.M., West C.** 1998. Refining rodent husbandry: the mouse. *Laboratory Animals.* 32(3):233-259.
- Johnson J.L., Jones M.B., Cobb B.A.** 2014. Polysaccharide A from the capsule of *Bacteroides fragilis* induces clonal CD4⁺ T cell expansion. *J. Biol. Chem.* doi: 10.1074/jbc.M114.621771.
- Kabeya H., Maruyama S., Irei M., Takahashi R., Yamashita M., Mikami,T.** 2002. Genomic variations among *Bartonella henselae* isolates derived from naturally infected cats. *Vet. Microbiol.* 89, 211-221.
- Kabeya H., Sase M., Yamashita M., Maruyama S.** 2006. Predominant T helper 2 immune responses against *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *Microbiol. Immunol.* 50(3):171-8.
- Kabeya H., Yamasaki A., Ikariya M., Negishi R., Chomel B.B., Maruyama S.** 2007. Characterization of Th1 activation by *Bartonella henselae* stimulation in BALB/c mice: Inhibitory activities of interleukin-10 for the production of interferon-gamma in spleen cells. *Vet Microbiol.* 119(2-4):290-6.

- Kabeya H., Umehara T., Okanishi H., Tasaki I., Kamiya M., Misawa A., Mikami T., Maruyama S.** 2009. Experimental infection of cats with *Bartonella henselae* resulted in rapid clearance associated with T helper 1 immune responses. *Microbes. Infect.* 11(6-7):716-20.
- Kaiser P.O., Riess T., Wagner C.L., Linke D., Lupas A.N., Schwarz H., Raddatz G., Schäfer A., Kempf V.A.** 2008. The head of *Bartonella* adhesin A is crucial for host cell interaction of *Bartonella henselae*. *Cell Microbiol.* 10(11):2223-34.
- Kaiser P.O., Linke D., Schwarz H., Leo J.C., Kempf V.A.J.** 2012. Analysis of the BadA stalk from *Bartonella henselae* reveals domain-specific and domain-overlapping functions in the host cell infection process. *Cellular Microbiology.* 14(2), 198–209
- Karem K.L., Dubois K.A., McGill S.L., Regnery R.L.** 1999. Characterization of *Bartonella henselae*-specific immunity in BALB/c mice. *Immunology.*97:352–358.
- Karem K.L., Paddock C.D., Regnery R.L.** 2000. *Bartonella henselae*, *B. quintana*, and *B. bacilliformis*: historical pathogens of emerging significance. *Microbes. Infect.* 2(10):1193-205.
- Karris M.Y., Litwin C.M., Dong H.S., Vinetz J.** 2011. *Bartonella henselae* Infection of Prosthetic Aortic Valve Associated with Colitis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(11): 1503–1505.
- Kayama H., Takeda K.** 2014. Polysaccharide A of *Bacteroides fragilis*: Actions on Dendritic Cells and T Cells. *Cell Press.* 54:206-207.
- Kempf V.A., Schaller M., Behrendt S., Volkmann B., Aepfelbacher M., Cakman I., Autenrieth I.B.** 2000. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cellular Microbiology* 2, 431-441.
- Kempf V.A., Schairer A., Neumann D., Grassl G. A., Lauber K., Lebidziejewski M. Schaller M., Kyme P., Wesselborg I S., Autenrieth. B.** 2005a. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell. Microbiol.* 7:91–104.
- Kempf V.A., Lebidziejewski M., Alitalo K., Wälzlein J.H., Eehalt U., Fiebig J., Huber S., Schütt B., Sander C.A., Müller S., Grassl G., Yazdi A.S., Brehm B., Autenrieth I.B.** 2005b. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation* 111: 1054–1062.
- Kim K.A., Shin Y.J., Kim J.H., Lee H., Noh S.Y., Jang S.H., Bae O.N.** 2012. Dysfunction of endothelial progenitor cells under diabetic conditions and its underlying mechanisms. *Arch Pharm Res.* 35:223.
- Kyme P., Dillon B., Iredell J.** 2003. Phase variation in *Bartonella henselae*. *Microbiology.* 149:621–629

- Koesling J., Aebischer T., Falch C., Schüle R., Dehio C.** 2001. Cutting edge: antibody-mediated cessation of hemotropic infection by the intraerythrocytic mouse pathogen *Bartonella grahamii*. *J. Immunol.* 167(1):11-4.
- Kordick D.L., Brown T.T., Shin K., Breitschwerdt E.B.** 1999. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats, *J. Clin. Microbiol.* 37:1536–1547.
- Kosoy M., Mandel E., Green D., Marston E., Childs J.** 2004. Prospective studies of *Bartonella* of rodents. I. Demographic and temporal patterns in population dynamics. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 4:285–295.
- Krishnamurthy P., Thal M., Verma S., Hoxha E., Lambers E., Ramirez V., Qin G., Losordo D., Kishore R.** 2011. Interleukin-10 deficiency impairs bone marrow-derived endothelial progenitor cell survival and function in ischemic myocardium. *Circ Res.* 109:1280.
- Kunz S., Oberle K., Sander A., Bogdan C., Schleicher U.** 2008. Lymphadenopathy in a novel mouse model of *Bartonella*-induced cat scratch disease results from lymphocyte immigration and proliferation and is regulated by interferon-alpha/beta. *Am. J. Pathol.* 172(4):1005-18.
- Kyme P.A., Haas A., Schaller M., Peschel A., Iredell J., Kempf V.A.** 2005. Unusual trafficking pattern of *Bartonella henselae*-containing vacuoles in macrophages and endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 7:1019–1034.
- Laflamme M.A., Sebastian M.M., Buetow B.S.** 2012. *Comparative Anatomy and Histology. A Mouse and Human Atlas.* Elsevier. Cap. 10:149-152.
- Lee L.C., Chen C.S., Choong P.F., Low A., Tan H.C., Poh K.K.** 2010. Time-dependent dynamic mobilization of circulating progenitor cells during percutaneous coronary intervention in diabetics. *Int J Cardiol.* 142: 199-201.
- Libby P.** 2000. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis and stabilization. *Am J Cardiol.* 86(8B):3J-8J.
- Liguori A., Fiorito C., Balestrieri M.L., Crimi E., Bruzzese G., Williams-Ignarro S., D'Amora M., Sommese L., Grimaldi V., Minucci P.B., Giovane A., Farzati B., Ignarro L.J., Napoli C.** 2008. Functional impairment of hematopoietic progenitor cells in patients with coronary heart disease. *Eur J Haematol.* 80:258-264.
- Lindner J.G., Marcelis J.H., de Vos N.M., Hoogkamp-Korstanje J.A.** 1979. Intracellular polysaccharide of *Bacteroides fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* 111:93–99.
- Linke D., Riess T., Autenrieth I.B., Lupas A., Kempf V.A.** 2006. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol.* 14: 264–270.

- Liu C.H., Lee S.M., VanLare J.M., Kasper D.L., Mazmanian S.K.** 2008. Regulation of surface architecture by symbiotic bacteria mediates host colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 105(10):3951–3956.
- Loosman C.J., Koning E.J., Staal F.J., Rookmaaker M.B., Verseyden C., de Boer H.C., Verhaar M.C., Braam B., Rabelink T.J., van Zonneveld A.J.** 2004. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type I diabetes. *Diabetes*. 53:195-9.
- Madonna R., De Caterina R.** 2011. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes—part II: cellular mechanisms and therapeutic targets. *Vascul Pharmacol*. 54:75.
- Maguina C., Gotuzzo E.** 2000. Bartonellosis- New and old. *Infectious Disease Clinics North America*. 14(1):1-22.
- Mandle T., Einsele H., Schaller M., Neumann D., Vogel W., Autenrieth I.B., Kempf V.A.J.** 2005, Infection of human CD34 progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. *Blood* 106:1215–1222.
- Marignac G., Barrat F., Chomel B., Vayssier-Taussat M., Gandoin C., Bouillin C., Boulouis H.J.** 2010. Murine model for *Bartonella birtlesii* infection: New aspects. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 33(2):95-107.
- Maruyama S., Kasten R.W., Boulouis H.J., Gurfield N.A., Katsube Y., Chomel BB.** 2001. Genomic diversity of *Bartonella henselae* isolates from domestic cats from Japan, the USA, and the France by pulse-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*. 79(4):337-349.
- Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L.** 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 122:107–118.
- Mazmanian S.K., Round J.L., Kasper D.L.** 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*. 453:620–625.
- Matsuzaki G., Umemura M.** 2007. Interleukin-17 as an Effector Molecule of Innate and Acquired Immunity against Infections. *Microbiol Immunol*. 51:1139–1147.
- McCord A.M., Cuevas J., Anderson B.E.** 2007. *Bartonella*-induced endothelial cell proliferation is mediated by release of calcium from intracellular stores. *DNA Cell Biol.*; 26(9): 657-63.
- Medina R.J., O'Neill C.L., Sweeney M., Guduric-Fuchs J., Gardiner T.A., Simpson D.A., Stitt A.W.** 2010. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Medical Genomics*. 3:18.

- Melhem A., Muhanna N., Bishara A., Alvarez C.E., Ilan Y., Bishara T., Horani A., Nassar M., Friedman S.L., Safadi R.** 2006. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatol.* 45:60–71.
- Meng G., Surana N.K., St Geme J. 3rd, Waksman G.** 2006. Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *EMBO J.* 25:2297–2304.
- Merrell D.S., Falkow S.** 2004. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature.* 430(6996):250-6.
- Mogil J.S., Wilson S.G., Bon K., Lee S.E., Chung K., Raber P., Pieper J.O., Hain H.S., Belknap J.K., Hubert L., Elmer G.I., Chung J.M., Devor M.** 1999. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain.* 80(1-2):67-82.
- Mohle R., Bautz F., Rafii S., Moore M.A., Brugger W., Kanz L.** 1998. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood.* 91:4523-4530.
- Moroni M., Esposito R., De Lalla F.** 2008. *Malattie infettive.* Elsevier-Masson. 813.
- Müller N.F., Kaiser P.O., Linke D., Schwarz H., Riess T., Schäfer A., Eble J.A., Kempf V.A.** 2011. Trimeric autotransporter adhesin-dependent adherence of *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* and *Yersinia enterocolitica* to matrix components and endothelial cells under static and dynamic flow conditions. *Infect Immun.* 79: 2544–2553.
- Musso T., Badolato R., Ravarino D., Stornello S., Panzanelli P., Merlino C., Savoia D., Cavallo R., Ponzi A.N., Zucca M.** 2001. Interaction of *Bartonella henselae* with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response. *Infect. Immun.* 69(10):5974-80.
- Myers L.L., Shoop D.S.** 1987. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in young pigs. *Am. J. Vet. Res.* 48:774–775.
- Nishioka K., Ida S., Takishima T.** 1985. Antibiotic sensitivity of *Haemophilus influenzae* clinically isolated in Sendai area. *Jpn J. Antibiot.* 38(11): 3105-10.
- Ó Cróinín, Steffen Backert.** 2012. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism?. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* doi: 10.3389/fcimb.2012.00025
- O'Reilly K.L., Parr K.A., Brown T.P., Tedder-Ferguson B., Scholl D.T.** 2001. Passive antibody to *Bartonella henselae* protects against clinical disease following homologous challenge but does not prevent bacteremia in cats. *Infect. Immun.* 69(3):1880-2.

- Ochoa-Reparaz J., Mielcarz D.W., Ditrio L.E., Burroughs A.R., Foureau D.M., Haque-Begum S., Kasper L.H.** 2009. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 183:6041–6050.
- Ochoa-Reparaz J., Mielcarz D.W., Wang Y., Begum-Haque S., Dasgupta S., Kasper D.L., Kasper L.H.** 2010. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol.* 3:487–495.
- Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhauser M., Werner C.** 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells.* 22(3):377-84.
- Otto B.R., Sparrius M., Verweij-van Vught A.M.J.J., MacLaren D.M.** 1990. Iron regulated outer membrane protein of *Bacteroides fragilis* involved in heme uptake. *Infect. Immun.* 58:3954–3958.
- Oyston P.C., Handley P.S.** 1991. Surface components of *Bacteroides fragilis* involved in adhesion and haemagglutination. *J. Med. Microbiol.* 34:51–55.
- Paik Y.H., Lee K.S., Lee H.J., Yang K.M., Lee S.J., Lee D.K., Han K.H., Chon C.Y., Lee S.I., Moon Y.M., Brenner D.A.** 2006. Hepatic stellate cells primed with cytokines upregulate inflammation in response to peptidoglycan or lipoteichoic acid. *Lab Invest.* 86:676–686.
- Papayannopolus T.** 2004. Current mechanistic scenarios in hematopoietic/stem cells mobilization. *Blood.* 103:1580-1585.
- Patrick S., McKenna J.P., O'Hagan S., Dermott E.** 1996. A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. *Microb. Pathog.* 20:191–202.
- Patrick S., Blakely G.W., Houston S., Moore J., Abratt V.R., Bertalan M., Cerdeno-Tarraga A.M., Quail M.A., Corton N., Corton C., Bignell A., Barron A., Clark L., Bentley S.D., Parkhill J.** 2010. Twenty-eight divergent polysaccharide loci specifying within- and amongst-strain capsule diversity in three strains of *Bacteroides fragilis*. *Microbiology.* 156:3255–3269.
- Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Raffi S.** 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursor. *Blood.* 95:952-958.
- Pérez R.P., Torres P.R., Prieto V.H., Vargas E.T.** 2012. Hepatosplenic peliosis: A case report and a literature review. *Rev Col Gastroenterol.* 27(1):46-55.
- Pugh C.W., Ratcliffe P.J.** 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 9:677–684.

- Pumbwe L., Skilbeck C.A., Wexler H.M.**. 2006. The *Bacteroides fragilis* cell envelope: quarterback, linebacker, coach—or all three? *Anaerobe* 12: 211–220.
- Qin G., Li M., Silver M., Wecker A., Bord E., Ma H., Gavin M., Goukassian D.A., Yoon Y.S., Papayannopoulou T., Asahara T., Kearney M., Thorne T., Curry C., Eaton L., Heyd L., Dinesh D., Kishore R., Zhu Y., Losordo D.W.**. 2006. Functional disruption of alpha4 integrin mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitors and augments ischemic neovascularization. *J Exp Med*. 203:153.
- Quaini F., Urbanek K., Feltrami A.P., Finato C.A., Nadal-Ginard B., Kajstura J., Leri A., Anversa P.**. 2002. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 346(1):5-15.
- Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R.**. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 118:229.
- Regnath T., Mielke M.E.A., Arvand M., Hahn H.**. 1998. Murine Model of *Bartonella henselae* Infection in the Immunocompetent Host. *Infection and Immunity*. 66(11):5534–5536.
- Rehman J., Li J., Orschell C.M., March K.L.**. 2003. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 107:1164-1169.
- Rehman J., Li J., Parvathaneni L., Karlsson G., Panchal V., Temm C.J., Mahenthiran J.**. 2004. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol*. 43:2314-8.
- Reid G.** 2004. When microbe meets human. *Clin. Infect. Dis*. 39:827–830.
- Rhodin J.A.G.**. 1980. Architecture of the vessel wall. *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*, p. 1. Bethesda, MD, American Physiology Society.
- Ribatti D., Vacca A., Nico B., Ria R., Damacco F.**. 2002. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathway. *Curr Mol Med*. 2:537-543.
- Richard J.F., Petit L., Gibert M., Marvaud J.C., Bouchaud C., Popoff M.R.**. 1999. Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. *Int Microbiol.* 2:185–194.
- Ricciardi C.** 1997. Sistemi biologici complessi come modelli sperimentali e di tossicologia prenatale. *Ann. Ist. Sup. Sanità*. 33(4):531-539.
- Riess T., Andersson S.G., Lupas A., Schaller M., Schäfer A., Kyme P., Martin J., Wälzlein J.H., Ehehalt U., Lindroos H., Schirle M., Nordheim A., Autenrieth I.B., Kempf V.A.**. 2004. *Bartonella* adhesin A mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med*. 200: 1267–1278.

- Rogers A.B., Dintzis R.Z.** 2012. Comparative Anatomy and Histology. A Mouse and Human Atlas. Elsevier. Chapt. 13:193-199.
- Round J.L., Lee S.M., Li J., Tran G., Jabri B., Chatila T.A., Mazmanian S.K.** 2011. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*. 332:974–977.
- Salvatore P., Casamassimi A., Sommese L., Fiorito C., Ciccodicola A., Rossiello R., Avallone B., Grimaldi V., Costa V., Rienzo M., Colicchio R., Williams S., Pagliarulo C., Prudente M., Abbondanza C., Lamberti F., Baroni A., Buommino E., Farzati B., Tufano M., Joseph Ignarro L.S. and Napoli C.** 2008. Detrimental effects of *Bartonella henselae* are counteracted by L-arginine and nitric oxide in human endothelial progenitor cells. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*. 105(27):9427-9432.
- Schauer R.** 2004. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology (Jena)* 107:49–64.
- Schulein R., Seubert A., Gille C., Lanz C., Hansmann Y., Pie'mont Y., Dehio C.** 2001. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J. Exp. Med.* 193:1077–1086.
- Schumann B., Pragani R., Anish C., Pereira C.L., Seeberger P.H.** 2014. Synthesis of conjugation-ready zwitterionic oligosaccharides by chemoselective thioglycoside activation. *Chemical Science*. 5:1992-2002.
- Schweyer S., Fayyazi A.** 2002. Activation and apoptosis of macrophages in cat scratch disease. *J Pathol*. 198(4):534-40.
- Shantsila E., Watson T., Lip G.Y.H.** 2007. Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Disorders. *Journal of the American College of Cardiology*. 49(7): 741-752.
- Shen Y., Giardino Torchia M.L., Lawson G.W., Karp C.L., Ashwell J.D., Mazmanian S.K.** 2012. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe*. 12(4):509-20.
- Shintani S., Murohara T., Ikeda H., Ueno T., Honma T., Katoh A., Sasaki K., Shimada T., Oike Y., Imaizumi T.** 2001. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 103:2776-2779.
- Simpler D., Shaohua W., Wang M.D., Deb A., Holmes D., McGregor C., Frantz R., Sudhir S., Kushwaha M.D., Noel M., Calice M.D.** 2003. Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy in blood of endothelial cells of noncardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis. *Circulation*. 107:143-149.
- Smadja D.M., Bieche I., Helley D., Laurendeau I., Simonin G., Muller L., Aiach M., Gaussem P.** 2007. Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells

- expansion enhances *in vitro* angiogenesis with up-regulation of integrin alpha(6). *J Cell Mol Med.* 11:1149.
- Smith C.J., Bryant M.P.**. 1979. Introduction to the metabolic activities of intestinal bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 32:149–157.
- Smith C.M., Smith J.S., Roth M.J.**. 1999. RNase H requirements for the second strand transfer reaction of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol.* 73(8):6573-81.
- Sood F.H., Phatak V.D., Chaudhari M.S.**. 1997. Bartonellosis and human immunodeficiency disease (AIDS): L-form as persisters, activating factors, and mechanism of disease. *Medical Hypotheses*, 48(6):511-515.
- Southern J.A., Parker J.R., Woods D.R.**. 1986. Expression and purification of glutamine synthetase cloned from *Bacteroides fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* 132:2827–2835.
- Stehle H.W., Leblebicilglu B., Waters J.D.**. 2001. Shortchain carboxylic acids produced by Gram-negative anaerobic bacteria can accelerate or delay polymorphonuclear leukocyte apoptosis *in vitro*. *J. Periodontol.* 72:1059–1063.
- Steiner S., Niesser A., Ziegler S., Richter B., Sidinger D., Pleiner J., Penka M., Wolzt M., Huber K., Wojta J., Minar E., Kopp C.W.**. 2005. Endurance training increased the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 181:305-310.
- Stephen T.L., Niemeyer M., Tzianabos A.O., Kroenke M., Kasper D.L., Kalka-Moll W.M.**. 2005. Effect of B7-2 and CD40 signals from activated antigen-presenting cells on the ability of zwitterionic polysaccharides to induce T-Cell stimulation. *Infect Immun.* 73:2184–2189.
- Strachan T., Read A.P.**. 1999. Comparison of genome organization and gene expression in humans and mice. *Human Molecular Genetics*. Wiley-Liss.
- Strehlow K., Werner N., Berweiler J., Link A., Dirnagl U., Priller J., Laufs K., Ghaeni L., Milosevic M., Bohm M., Nickenig G.**. 2003. Gestrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation.* 107:3059-3065.
- Surana N.K., Kasper D.L.**. 2012. The yin yang of bacterial polysaccharides: lessons learned from *B. fragilis* PSA. *Immunological Reviews.* 245:13–26.
- Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J.M., Asahara T.**. 1999. Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 5(4):434-8.

- Takeda K., Kaisho T., Akira S.** 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335.
- Tanaka H., Ito F., Iwasaki T.** 1992. Purification and characterization of a sialidase from *Bacteroides fragilis* SBT3182. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:524–529.
- Tartara C., Lucena F., Jofre J.** 1989. Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. *Applied and Environmental Microbiology.* 55(10):2696-2701.
- Tsai H.H., Sunderland D., Gibson G.R., Hart C.A., Rhodes J.M.** 1992. A novel mucin sulphatase from human faeces: its identification, purification and characterization. *Clin Sci (Lond).* 82: 447-454.
- Tzianabos A.O., Onderdonk A.B., Rosner B., Cisneros R.L., Kasper D.L.** 1993. Structural features of polysaccharides that induce intra-abdominal abscesses. *Science.* 262:416.
- Tzianabos A.O., Finberg R.W., Wang Y., Chan M., Onderdonk A.B., Jennings H.J., Kasper D.L.** 2000. T cells activated by zwitterionic molecules prevent abscesses induced by pathogenic bacteria. *J Biol Chem.* 275:6733–6740.
- Tzianabos A.O., Wang J.Y., Lee J.C.** 2001. Structural rationale for the modulation of abscess formation by *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:9365.
- Urbich C., Heeschen C., Aicher A., Dernbach E., Zeiher A.M., Dimmler S.** 2003. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation.* 108(29):2511-6.
- Urbich C., Dimmler S.** 2004. Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Research.* 95:343-353.
- Varanat M., Broadhurst J., Linder K.E., Maggi R.G., Breitschwerdt E.B.** 2012. Identification of *Bartonella henselae* in 2 Cats With Pyogranulomatous Myocarditis and Diaphragmatic Myositis. *Veterinary Pathology.* 49(4) 608-611.
- Varel V.H., Bryant M.P.** 1974. Nutritional features of *Bacteroides fragilis* sp. *fragilis*. *Appl. Microbiol.* 28:251–257.
- Vasa M., Fichtlscherer S., Adler K., Aicher A., Martin H., Zeiher A.M., Dimmler S.** 2001. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 103(24):2885-90.
- Wang Q., McLoughlin R.M., Cobb B.A., Charrel-Dennis M., Zaleski K.J., Golenbock D., Tzianabos A.O., Kasper D.L.** 2006. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 203:2853.
- Wang Y., Telesford K.M., Ochoa-Reparaz J., Haque-Begum S., Christy M., Kasper E.J., Wang L., Wu Y., Robson S.C., Kasper D.L., Kasper L.H.** 2014. An intestinal commensal symbiosis

- factor controls neuroinflammation via TLR2-mediated CD39 signalling. *Nature communications*. 5:4432.
- Wang S.C., Ohata M., Schrum L., Rippe R.A., Tsukamoto H.** 1998. Expression of interleukin-10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 273:302–308.
- Watts C, Powis S.** 1999. Pathways of antigen processing and presentation. *Rev Immunogenet*. 1:60–74.
- Weibel E.R., Palade G.E.** 1964. New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J. Cell. Biol.* 23:101.
- Weiss E., Dasch G.A., Woodman D.R., Williams J.C.** 1978. Vole agent identified as a strain of the trench fever Rickettsia, *Rochalimaea quintana*. *Infect. Immun.* 19:1013–1020.
- Werner N., Kisiol S., Schiegl T., Ahlers P., Talenta K., Link A., Bohm M., Nickenig G.** 2005. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 353:999-1007.
- Willing B.P., Russell S.L., Finlay B.B.** 2011. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature reviews, microbiology*. 9:233-243.
- Wollmann P., Zeth K., Lupas A.N., Linke D.** 2006. Purification of the YadA membrane anchor for secondary structure analysis and crystallization. *Int J Biol Macromol*. 39:3–9.
- Wu S., Lim K.C., Huang J., Saidi R.F., Sears C.L.** 1998. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14979–14984.
- Yamaguchi J., Kusano K.F., Masuo O., Kawamoto A., Silver M., Murasawa S., Bosch-Marce M., Masuda H., Lo sordo D.W., Isner J.M., Asashara T.** 2003. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex-vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 107:1322-1328.
- Yamamoto I., Abe A., Saito H., Ishimoto M.** 1984. The pathway of ammonia assimilation in *Bacteroides fragilis*. *J. Gen. App. Microbiol*. 30:499–508.
- Yamamoto K., Chomel B.B., Kasten R.W., Chang C.C., Tseggai T., Decker P.R., Mackowiak M., Floyd-Hawkins K.A., Pedersen N.C.** 1998. Homologous protection but lack of heterologous-protection by various species and types of *Bartonella* in specific pathogen-free cats. *Vet Immunol Immunopathol*. 65(2-4):191-204.
- Yuan C., Zhu C., Bai Y., Yang X., Hua X.** 2012. Staining of *Bartonella henselae* with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester for tracking infection in erythrocytes and epithelial cells. *Journal of Microbiological Methods*. 89:102–106.

Sitografia:

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

www.netterimages.com

www.antropozoonosi.it

www.jaxmice.jax.org

www.criver.com

www.sabiosciences.com