

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**



**FACOLTA' DI
SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA APPLICATA
XXI CICLO**

**PROPRIETÀ IMMUNOMODULATORIE DI
BATTERI PROBIOTICI IN UN MODELLO MURINO
DI IPERSENSIBILITÀ INTESTINALE AL GLUTINE**

Coordinatore
Prof.ssa Amalia Virzo De Santo

Tutor
Prof. Ezio Ricca

Dottoranda
Rossana D'Arienzo

Supervisore
Dott. Mauro Rossi
Istituto di Scienze dell'Alimentazione (CNR – AV)

TRIENNIO 2005-2008

INDICE

| | | |
|--|-----|----|
| PREMESSA | pag | 1 |
| Sezione 1 - INTRODUZIONE | pag | 2 |
| ✓ La risposta immunitaria | pag | 3 |
| ✓ L'immunità innata | pag | 3 |
| ✓ I componenti dell'immunità innata | pag | 4 |
| ✓ L'immunità adattativa | pag | 6 |
| ✓ I componenti del sistema immunitario adattativo | pag | 7 |
| ✓ Il sistema immune mucosale | pag | 8 |
| ✓ Il GALT | pag | 9 |
| ✓ Anatomia del GALT | pag | 10 |
| ✓ La circolazione linfocitaria | pag | 12 |
| ✓ Le cellule all'interno del GALT | pag | 13 |
| ✓ La morfologia della mucosa intestinale | pag | 16 |
| ✓ La flora intestinale | pag | 17 |
| ✓ I probiotici | pag | 19 |
| ✓ Interazione tra probiotici e sistema immune | pag | 21 |
| ✓ Effetti immunologici in modelli animali | pag | 24 |
| SCOPO DEL LAVORO | pag | 26 |
| Sezione 2 - MATERIALI E METODI | pag | 27 |
| ✓ Preparazione dell'antigene | pag | 28 |
| ✓ Modello animale | pag | 28 |
| ✓ Generazione e trattamento delle cellule dendritiche derivate da midollo osseo | pag | 28 |
| ✓ Trattamento <i>in vivo</i> | pag | 29 |

| | | |
|---|-----|----|
| ✓ Preparazione e somministrazione dell'indometacina | pag | 30 |
| ✓ Probiotici: ceppi e condizioni di coltura | pag | 31 |
| ✓ Test di proliferazione cellulare | pag | 32 |
| ✓ Valutazione del profilo citochinico | pag | 33 |
| ✓ Valutazione fenotipica delle cellule dendritiche | pag | 34 |
| ✓ Valutazioni sul piccolo intestino | pag | 34 |
| ✓ Morfometria e immunoistochimica | pag | 34 |
| ✓ Analisi dell'apoptosi | pag | 35 |
| ✓ Valutazioni CD3, CD25 e F4/80 | pag | 36 |
| ✓ Dosaggio della prostaglandina E ₂ | pag | 39 |
| ✓ Real Time PCR Array | pag | 39 |
| ✓ Dosaggio dell'attività delle MMP | pag | 39 |
| ✓ Analisi statistica | pag | 40 |
| | | |
| Sezione 3 – RISULTATI | pag | 41 |
| ✓ L'immunizzazione mucosale stimola una risposta Th1 specifica per la gliadina nel topo transgenico DQ8 | pag | 42 |
| ✓ La co-somministrazione di <i>Lactobacillus casei</i> esacerba la risposta immune intestinale gliadina specifica | pag | 45 |
| ✓ Valutazioni sul piccolo intestino in seguito alla somministrazione di <i>L. casei</i> | pag | 47 |
| ✓ Effetti dell'inibizione delle ciclo-ossigenasi in topi DQ8 | pag | 48 |
| ✓ Valutazione dell'effetto di <i>L. casei</i> insieme con la somministrazione di indometacina in topi transgenici DQ8 sensibilizzati con la gliadina | pag | 50 |
| ✓ Effetto della somministrazione di indometacina in topi transgenici DQ8 sensibilizzati con la gliadina | pag | 52 |
| ✓ Meccanismi immuni coinvolti nel danno mucosale | pag | 54 |
| ✓ Meccanismi biochimici associati con l'inizio della lesione intestinale | pag | 59 |
| ✓ Effetto di alcuni ceppi di <i>Lactobacillus</i> e effetto di <i>Bifidobacterium lactis</i> sulle cellule dendritiche derivate da midollo osseo di topi transgenici DQ8 | pag | 63 |
| ✓ Analisi della risposta immune intestinale specifica per la gliadina | | |

| | | |
|---|-----|----|
| indotta dalla co-somministrazione dei probiotici nel topo DQ8 | pag | 66 |
| Sezione 4 – DISCUSSIONE | pag | 69 |
| ✓ Discussione | pag | 70 |
| Sezione 5 – BIBLIOGRAFIA | pag | 80 |
| ✓ Bibliografia | pag | 81 |
| Sezione 6 – PUBBLICAZIONI | pag | 98 |
| ✓ Elenco delle pubblicazioni prodotte durante il triennio | pag | 99 |

PREMESSA

La prima fase sperimentale del dottorato di ricerca è stata dedicata alla conclusione di un progetto scientifico antecedente l'inizio del triennio ed è stata finalizzata alla messa a punto di un modello *in vivo* di infezione intestinale in topi NIH-Swiss. A tale scopo è stato utilizzato *Citrobacter rodentium*, un batterio responsabile, nel topo, di una patologia enterica simile a quella indotta nell'uomo dai ceppi di *Escherichia coli* enteropatogenici. Il lavoro svolto ha permesso di individuare le quantità di batterio necessarie per indurre, negli animali in trattamento, il danneggiamento della mucosa intestinale, la successiva invasione degli organi interni analizzati (fegato e milza) ed un elevato tasso di mortalità. Il modello di infezione è stato quindi utilizzato per valutare la capacità da parte delle spore di *Bacillus subtilis*, comunemente utilizzate in preparazioni probiotiche commerciali, di ridurre l'infezione causata da *C. rodentium*, somministrando le spore 24 ore prima del patogeno. A seguito di questo trattamento si è verificata una ridotta mortalità e un danno mucosale inferiore rispetto agli animali di controllo (trattati solo con *C. rodentium*). Questi risultati indicano che l'azione probiotica delle spore utilizzate può essere spiegata, almeno in parte, sulla base della competizione tra il patogeno e le spore stesse. I risultati ottenuti sono stati oggetto di una pubblicazione allegata alla fine della presente tesi di dottorato [D'Arienzo R., et al, 2006].

La successiva fase sperimentale è consistita nella valutazione delle proprietà immunomodulatorie di batteri probiotici in un modello murino di ipersensibilità intestinale al glutine, oggetto del dottorato di ricerca i cui dettagli sono illustrati nella presente tesi.

Sezione 1

INTRODUZIONE

La risposta immunitaria

Il sistema immunitario difende l'organismo dagli agenti patogeni attraverso l'attuazione di una risposta, resa efficace dalla coesistenza di due tipologie di reazioni: una precoce, che non necessita di una pre-esposizione all'antigene ed è nota come immunità innata; l'altra, invece, coinvolge cellule altamente specializzate, i linfociti ed è nota come immunità adattativa (o cellulo-mediata) [**Abbas A**, 2002].

L'immunità innata

Il riconoscimento dei patogeni da parte del sistema innato costituisce un prerequisito per una efficace difesa dell'ospite ed è mediato da un insieme di recettori che l'evoluzione ha selezionato per riconoscere profili molecolari conservati, comuni ad un ampio gruppo di organismi. Molti di questi componenti costitutivi dei patogeni non sono riscontrabili nell'ospite e pertanto vengono indicati come profili molecolari specifici dei patogeni (PAMPs, Pathogens Associated Molecular Patterns) [**R. Medzhitov**, 1997].

I PAMPs hanno delle caratteristiche ben precise [**Janeway CA Jr.** 1992; **Fearon DL**, 1996; **Medzhitov R**, 2000; **Medzhitov R**, 1997]:

- sono prodotti solo dai microrganismi e non dagli Eucarioti, quindi specifici dell'invasore e non dell'ospite;
- sono essenziali per la patogenicità o la sopravvivenza dei microrganismi;
- sono strutture altamente conservate e comuni a molte classi di patogeni;
- non possono essere modificati dai microrganismi e quindi possono essere sempre riconosciuti.

Gli specifici recettori che si legano ai PAMPs sono stati identificati come recettori di riconoscimento dei profili (PRR, pathogen recognition pattern) [Abbas A, 2002]. La famiglia dei PRR meglio caratterizzata è quella dei Toll-like receptor (TLR), presenti su molte cellule dell'immunità innata, quali macrofagi, cellule natural killer, fagociti e cellule dendritiche.

L'attivazione dei TLR induce l'espressione di fattori chemotattici e molecole di superficie cellulare e questo innesca il reclutamento delle cellule al sito di infezione per eliminare i patogeni [Iwasaki, A., 2004].

Nei mammiferi la famiglia dei TLR contiene almeno 10 membri, ognuno con una elevata e caratteristica specificità; di seguito ne sono citati alcuni solo come esempio: TLR4 è responsabile del riconoscimento dei batteri Gram negativi; il riconoscimento del lipopolisaccaride (LPS), presente su tutti i Gram negativi e non nell'ospite, rappresenta il PAMP che media questo processo [Poltorak A., 1998; Hoshino K, 1999].

TLR2 è coinvolto nel riconoscimento dei batteri Gram positivi tramite il riconoscimento dell'acido lipoteicoico e del peptidoglicano [Ozinsky A, 2000]. TLR9 individua sequenze di DNA contenenti dinucleotidi non metilati citosin-guanidina (CpGs) [Hemmi H, 2000].

Componenti dell'immunità innata

Nei mammiferi l'immunità innata è attuata da cellule epiteliali, neutrofili, macrofagi, cellule natural killer (NK), cellule dendritiche (DC), citochine e fattori del complemento. [Abbas A, 2002].

Le cellule dendritiche sono APC (antigen presentig cell) specializzate, in grado di catturare, processare e presentare l'antigene (peptidi derivati dai microbi) alle cellule T; sono altamente specializzate per l'attivazione della risposta immune adattativa e rappresentano un sistema unico nel riconoscimento dell'antigene. Sono infatti le sole cellule capaci di indurre una risposta immune primaria attivando i linfociti T naïve,

consentendo quindi l'instaurarsi della memoria immunologica [Banchereau, J., 2000]. Queste cellule sono munite di differenti PRR che consentono loro di individuare la presenza di patogeni e determinarne l'identità. Questo le rende capaci di "decidere" se deve iniziare una risposta immune adattativa oltre che determinare il tipo e l'intensità della risposta. Per questo motivo le DC ricoprono un ruolo cruciale nell'inizio e nella regolazione della risposta immune [Janeway, C. A., Jr. 2002; Palucka, K. 2002]. Queste cellule hanno, infatti, un importante ruolo nella differenziazione delle cellule Th naïve in cellule Th1 o Th2. Questo processo dipende dal tipo di molecole costimolatorie espresse e dalle citochine secrete dalle cellule dendritiche [Kapsenberg, M. L. 2003]. L'attivazione dei TLR sulle cellule dendritiche, indotta dai patogeni, ha come risultato l'induzione di una risposta Th1, anche se alcuni autori menzionano anche una risposta Th2 attraverso TLR2. In pratica queste cellule la caratteristica di accoppiare il riconoscimento microbico mediato dai TLR con una appropriata risposta immune adattativa [Iwasaki, A., 2004].

Le cellule dendritiche rappresentano una popolazione cellulare eterogenea e sono presenti nella maggior parte dei tessuti periferici, in particolare nei siti che costituiscono l'interfaccia con l'ambiente esterno, quali la cute e le mucose [Banchereau, J., 2000; Banchereau, J., 1998]. Inoltre le cellule dendritiche circolano nel sangue, e negli organi linfoidi secondari. Nei tessuti periferici queste cellule catturano gli antigeni, self e non self, li internalizzano e li processano rendendoli peptidi proteolitici, che vengono poi caricati sulle molecole MHC di classe I e II; in assenza di risposta immune le cellule dendritiche restano nello stato immaturo e non si differenziano [Steinman, R. M. 2002]. Stimoli infiammatori, come TNF- α e IL-1 β , batteri, prodotti batterici (LPS) e virus, inducono le cellule dendritiche, che hanno "caricato" l'antigene, a migrare dai tessuti periferici agli organi linfoidi secondari. Durante la migrazione subiscono un processo di maturazione, che le porta ad incrementare enormemente la propria capacità di attivare le cellule T. La maturazione delle cellule dendritiche si concretizza con l'aumentata espressione di membrana di alcune molecole chiave nell'interazione tra APC e linfocita: molecole di adesione, molecole del sistema HLA e molecole di costimolazione [Bancherau J, 1998; Metha

Damani A, 1994]. Queste cellule esprimono gli antigeni HLA di classe II (HLA-DR, -DQ, -DP) e le molecole di costimolazione (CD80,CD86,CD40), le quali interagendo con il proprio ligando presente sui linfociti T (CD28, CTLA-4, CD40L), forniscono il “secondo segnale”, indispensabile per indurre, al momento del riconoscimento antigenico, una risposta proliferativa e non anergia [**Bancherau J**, 1998]. Inoltre, le DC sono anche in grado di produrre citochine, tra cui IL-12, che ha la funzione di promuovere una risposta immunitaria di tipo citotossico o infiammatoria attraverso la differenziazione delle cellule Th0 in cellule Th1, produttori interferone (IFN)- γ e IL-2 [**Macatonia SE**, 1995; **Cella M**, 1996].

L'immunità adattativa

L'immunità specifica rappresenta la funzione effettrice svolta dai linfociti; esistono due tipi di risposte immunitarie specifiche, denominate immunità umorale e immunità cellulare [**Abbas A**, 2002].

L'immunità umorale è mediata da molecole circolanti prodotte dai linfociti B e denominate anticorpi. Queste molecole riconoscono specificamente gli antigeni microbici e li destinano alla eliminazione. L'immunità umorale rappresenta il principale meccanismo di difesa contro i microbi extracellulari e contro le tossine da essi prodotte [**Abbas A**, 2002].

L'immunità cellulare (definita anche cellulo-mediata) è mediata da linfociti T e favorisce la distruzione dei microbi che si trovano all'interno dei fagociti o la lisi delle cellule infettate [**Abbas A**, 2002]. I linfociti T possono essere suddivisi in sottopopolazioni funzionalmente distinte, tra cui le meglio caratterizzate sono le cellule T helper e le cellule T citotossiche (o citolitiche); le cellule T non sono in grado di riconoscere antigeni solubili, non producono anticorpi ed hanno una specificità ristretta per gli antigeni, riconoscendo solo peptidi antigenici legati a proteine autologhe codificate da geni presenti nel complesso maggiore di istocompatibilità

(Major Histocompatibility Complex, MHC) ed espresse sulla membrana delle APC [Abbas A, 2002]. Le risposte funzionali dei linfociti T, quindi, si innescano grazie al riconoscimento dei complessi MHC-peptide, esposti sulla membrana delle APC. Tali risposte richiedono un riconoscimento antigenico specifico, un'adesione stabile tra i linfociti T e le APC, e la trasmissione di segnali di attivazione all'interno delle cellule. Queste diverse componenti della risposta T sono mediate da gruppi diversi di molecole espresse sulla membrana dei linfociti T stessi [Abbas A, 2002]. I linfociti T ristretti per MHC riconoscono i complessi MHC-peptide esposti sulle APC grazie a recettori specifici (TCR) clonalmente distribuiti. Oltre ad esprimere il complesso TCR, i linfociti T esprimono anche molte molecole accessorie importanti per l'attivazione cellulare indotta dall'antigene. Alcune di queste molecole interagiscono con i ligandi espressi sulle APC o sulle cellule bersaglio, stabilizzando così l'adesione tra i due tipi cellulari, mentre altre trasmettono all'interno dei linfociti T i segnali di attivazione. CD4 e CD8 sono co-recettori espressi in maniera mutualmente esclusiva su sottopopolazioni diverse di linfociti T maturi; essi legano regioni non polimorfiche delle molecole MHC. CD4 è espresso sui linfociti T helper ristretti per classe II, mentre CD8 è espresso sui CTL ristretti per classe I. Quando i linfociti T riconoscono il complesso MHC-peptide, CD4 e CD8 trasducono segnali fondamentali per l'avvio della risposta T [Abbas A, 2002].

Le cellule T possono differenziare in due distinti sottogruppi: Th1 e Th2 [A.K. Abbas, 1996]. Le cellule Th1 secernono per lo più citochine effettrici del tipo dell'IFN- γ e sono coinvolte nell'immunità cellulare; le cellule Th2, invece, producono altre citochine, quali IL-4 e IL-10 e sono coinvolte nell'immunità umorale. La "decisione" di differenziare in Th1 o Th2 può essere diretta dalle cellule dendritiche e dipende dal particolare sottogruppo di dendritiche, dalla fase di maturazione o dal rapporto fra cellule dendritiche e cellule T [M. Moser, 2000; B. Pulendran, 2001].

I componenti del sistema immunitario adattativo

I linfociti sono le uniche cellule dell'organismo in grado di riconoscere specificamente l'antigene e distinguere i diversi determinanti antigenici. Essi sono pertanto responsabili delle due caratteristiche che definiscono le risposte immunitarie specifiche, ossia la specificità e la memoria [Abbas A, 2002]. I linfociti B sono responsabili della produzione di anticorpi; i linfociti T sono le cellule realmente effettrici dell'immunità cellulare e comprendono due sottopopolazioni: i linfociti T helper ed i linfociti T citotossici (CTL) [Abbas A, 2002]. La maggior parte dei linfociti T helper esprime una proteina di superficie chiamata CD4, mentre la maggior parte dei linfociti T citotossici esprime una proteina diversa, denominata CD8.

Il sistema immune mucosale

Il sistema immunitario è organizzato in tessuti ed organi, distinguibili in primari (o centrali) e secondari (o periferici). Gli organi linfoidei primari sono il timo ed il midollo osseo e costituiscono i siti in cui avviene il differenziamento delle cellule di difesa, a partire dalle cellule staminali. Gli organi linfoidei secondari comprendono sia organi capsulati quali milza e linfonodi che non capsulati quali tonsille e placche di Peyer che costituiscono a loro volta il tessuto linfoide associato alle mucose (MALT) [Roitt I, 2003]. In particolare la milza opera quella che viene definita "immunità sistemica", agendo contro le sostanze veicolate dal sangue; i linfonodi operano quella che viene definita "immunità cellulo-mediata locale", agendo contro le sostanze drenate dalla cute o dalle superfici interne attraverso i vasi linfatici.

Il meccanismo di difesa più importante contro i microrganismi patogeni ed i loro derivati è rappresentato dal sistema immunitario delle mucose, identificabile come tessuto linfoide associato alla mucosa, MALT. Queste formazioni non sono organizzate

a formare organi del sistema linfatico ma piuttosto come noduli linfatici (o anche cellule isolate).

I componenti del MALT si possono suddividere in 5 gruppi:

- GALT (gut-associated lymphoid tissue), tessuto linfoide associato all'intestino;
- BALT (bronchial-associated lymphoid tissue), tessuto linfoide associato all'area bronchiale;
- NALT (nose-associated lymphoid tissue), tessuto linfoide associato al naso;
- SALT (skin-associated lymphoid tissue), tessuto linfoide associato alla pelle;
- VALT (vascular-associated lymphoid tissue), tessuto linfoide associato ai vasi sanguigni, che rappresenta una nuova componente del MALT ma di cui ancora non si conosce il ruolo nella risposta immunitaria;
- CALT (conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye), tessuto linfoide associato alla congiuntiva;

Il ruolo del MALT è di assicurare una risposta immunitaria completa sia umorale che cellulare in seguito a stimoli antigenici locali. Questo tessuto infatti contiene diverse popolazioni di cellule del sistema immunitario adattativo quali i linfociti T e B e cellule presentanti gli antigeni, nonché componenti dell'immunità innata quali i macrofagi. Nell'ambito dell'apparato gastrointestinale si possono trovare particolari cellule, dette cellule M che sembrano internalizzare gli antigeni provenienti dalla digestione degli alimenti per portarli in contatto con le cellule immunitarie.

Il GALT

Il sistema immune mucosale gioca un ruolo essenziale nella difesa dell'ospite ed è continuamente esposto ad una grande quantità di antigeni esogeni (ad esempio quelli

introdotti con la dieta) ed endogeni (ad esempio batteri) [Jump RL, 2004;]. Deve essere in grado di discriminare tra patogeni che richiedono una risposta immune protettiva e la normale flora batterica o gli antigeni alimentari, verso cui è necessario lo sviluppo ed il mantenimento di uno stato di non responsività. Questa seconda caratteristica della risposta immune mucosale prende il nome di Tolleranza Orale [Wershil BK, 2008].

Anatomia del GALT

I componenti cellulari del GALT sono localizzati in microambienti quali le Placche del Peyer (PPs) e i Linfonodi Mesenterici (MLNs). Le cellule immunitarie del GALT consistono di cellule T e B e di Cellule Dendritiche (DCs), nonché tipi cellulari unici all'interno di questo sistema, quali le cellule M (microfold = micro pieghe), le cellule di Paneth ed i Linfociti Intraepiteliali (IELs) [Wershil BK, 2008].

La figura 1 illustra in dettaglio la relazione tra struttura e funzione del GALT, nel quale la fase induttiva è compartimentalizzata nelle PPs e nei MLNs, mentre la fase effettrice è realizzata dalla LP.

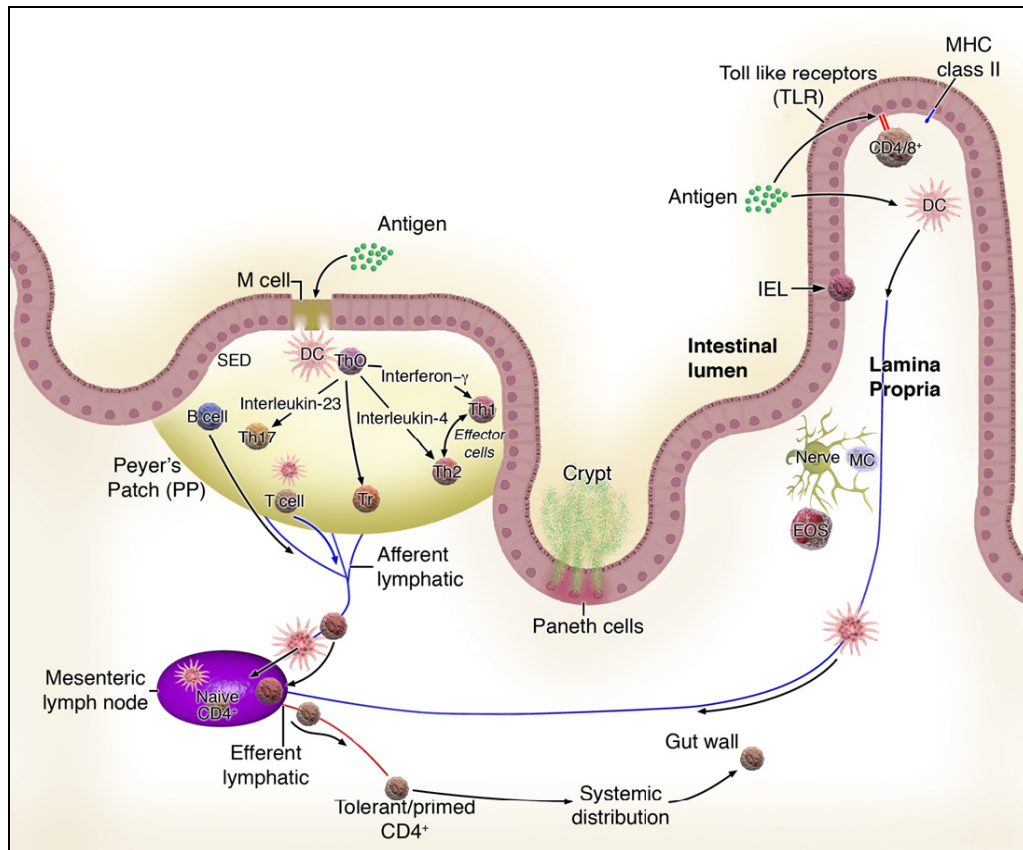


Figura 1: Anatomia della mucosa intestinale: gli antigeni possono attraversare l'epitelio attraverso le cellule M o le Cellule Dendritiche. Il dominio sub epiteliale (SED) è occupato da un numero di linfociti, comprendenti le cellule TH0, che sotto la direzione di specifiche citochine differenziano in cellule TH1, TH2, cellule T regolatorie o cellule TH17. Una popolazione aggiuntiva di linfociti include i Linfociti Intraepiteliali (IELs) che si trovano giustapposti tra le cellule epiteliali intestinali. Altre cellule residenti nella Lamina Propria (LP) e che probabilmente partecipano alla risposta immune sono le Mast Cellule (MC) e gli Eosinofili (EOS) [Wershil BK. 2008]

Le placche di Peyer sono aggregati linfoidi costituiti di ampi follicoli di cellule B, una regione interfollicolare di cellule T e numerosi macrofagi e Cellule Dendritiche. Questa area linfoide si trova sotto un monostrato di cellule a colonna ed è chiamato Epitelio Associato ai Follicoli (FAE). In tutto il FAE ci sono cellule M specializzate derivate dagli enterociti sotto l'influenza delle linfofossina $\alpha\beta$ [Debard N., 2001].

Le placche di Peyer si presentano anatomicamente come classici organi linfoidi secondari, con chiare aree B e T. Sono contenute nella porzione terminale dell'ileo, dove giacciono sulla sub mucosa, separate dal lume intestinale da un singolo strato di cellule epiteliali, l'epitelio associato ai follicoli (FAE). Oltre alla presenza degli enterociti, in questo strato epiteliale sono presenti anche cellule linfoidi di tutti i tipi, nonché popolazioni peculiari di cellule epiteliali specializzate, dette cellule M, diffuse tra gli enterociti, che hanno la funzione di caricare e trasportare gli antigeni all'interno del tessuto linfoide utilizzando le invaginazioni della membrana citoplasmatica [**Mowat AM, 1997; Neumann B, 1996**]. Le cellule M hanno principalmente la funzione di trasportare per via trans-epiteliale gli antigeni dal lume direttamente al tessuto linfoide sub-epiteliale. Alla base delle cellule M e del FAE si trova il dominio sub-epiteliale (SED), un'area ricca in linfociti B e T e cellule dendritiche. Queste ultime migrano all'interno delle placche di Peyer, catturando gli antigeni alla superficie basolaterale delle cellule M e poi si spostano verso la zona ricca in cellule T dell'area interfollicolare [**Wershil BK. 2008**].

La circolazione linfocitaria

La continua circolazione dei linfociti attraverso il circolo ematico ed i linfatici, da un tessuto linfoide secondario all'altro e poi ai focolai periferici di infezione, è un requisito essenziale per l'efficacia delle risposte immunitarie agli antigeni estranei. La migrazione dei linfociti tra questi diversi siti prende il nome di ricircolazione linfocitaria, ed il processo attraverso cui particolari sottopopolazioni di linfociti entrano in alcuni tessuti ma non in altri è denominato localizzazione linfocitaria. Lo spostamento dei linfociti da un tessuto all'altro, finemente regolata da numerosi fattori, viene chiamato anche reclutamento. La ricircolazione e la localizzazione dei linfociti assolvono a due funzioni importanti per l'economia delle risposte immuni: garantiscono che il piccolo numero di linfociti specifici per ogni singolo antigene estraneo presenti in un individuo, possa venire in contatto con quell'antigene;

garantiscono che le particolari sottopopolazioni di linfociti raggiungano proprio quel determinato microambiente tissutale dove la loro presenza è necessaria per lo svolgimento delle risposte immunitarie [Abbas A, 2002]. La ricircolazione linfocitaria è guidata dall'espressione di molecole di adesione sui linfociti e sulle cellule endoteliali dei vasi, e dipende dall'interazione e dall'adesione tra linfociti e cellule endoteliali vasali, e tra linfociti e compartimenti del tessuto connettivo extravascolare [Abbas A, 2002].

Le cellule linfoide associate alla mucosa circolano principalmente all'interno del GALT: le cellule linfoide, stimulate dall'antigene nelle PP attraversano i linfonodi regionali, si riversano nel circolo sanguigno e ritornano nella LP. Il traffico linfocitario tra il sistema ematico e i tessuti è fondamentale per la normale risposta immune. Questa circolazione consente contatti altamente efficienti tra i linfociti e gli antigeni derivati dai patogeni, che possono entrare nell'organismo attraverso numerose vie [Ebert, L.M., 2004].

Le cellule all'interno del GALT

I due terzi dei linfociti T sono CD4+, che riconoscono antigeni esogeni sulle molecole MHC di classe II. Dopo la migrazione verso la mucosa, essi rimangono nella lamina propria e sono localizzati uniformemente nell'area tra le cripte ed i villi. La rimanente porzione di linfociti T (un terzo) sono CD8+ che riconoscono gli antigeni esogeni presentati dalle MHC I e dopo essere entrati nella mucosa, preferiscono l'epitelio. Le cellule T con fenotipo "memoria" (che indicano un precedente contatto con l'antigene) sono i maggiori costituenti dell'epitelio e della LP. Le cellule T CD4+ della lamina propria giocano un ruolo importante nella regolazione immune locale. Le cellule T stimulate dall'antigene nella lamina propria possono essere cellule effettrici che aiutano le cellule B a produrre IgA (cellule Th2) secernendo citochine come IL-4, IL-5, IL-9 e IL-25 oppure possono avere una funzione pro-infiammatoria (Th1 secernendo

citochine come IFN- γ e TNF- α . Inoltre, Le cellule T della lamina propria possono agire come cellule T regolatorie e partecipare allo sviluppo della tolleranza nei confronti di antigeni ambientali [**Mowat AM.**, 2003; **Brandtzaeg P**, 2001; **Bellanti JA**, 2004].

I linfociti intraepiteliali (IELs) sono una particolare popolazione di cellule T, con caratteristiche differenti da quelle della LP. La maggior parte dei IELs appartiene alla sottopopolazione CD8+ [**MacDonald TT.**, 2003]. La maggior parte dei linfociti intraepiteliali esprime TCR α/β e sono cellule T della memoria [**Brandtzaeg P**, 1989], mentre la restante popolazione esprime il TCR γ/δ e presenta funzione citotossica.

Un ruolo importante nell'immunità mucosale è svolto dai linfociti B. La caratteristica delle cellule B è la presenza delle immunoglobuline come recettori antigenici, cellule B naïve esprimono IgM e IgD. Quando le cellule B agiscono come APC, gli antigeni legano le immunoglobuline di membrana, quindi le cellule B li processano e poi li presentano alle cellule T nella tasca del MHC-II. La stretta interazione delle cellule T e B permette la trasmissione del segnale tramite il ligando CD40 e il co-recettore CD40, cosa che porta all'inizio della commutazione della classe di immunoglobuline. Le cellule T modulano le cellule B secernendo citochine [**Alam R.**, 2003]. La commutazione di classe IgA avviene sotto l'effetto di TGF- β 1 e IL-10 [**Mowat AM.**, 2003], mentre IL-4 induce la secrezione di IgE e IgG [**Pene J**, 1988]. Le cellule B attivate escono dalle placche di Peyer attraverso i linfonodi regionali, si immettono nel torrente circolatorio ed entrano nella lamina propria, dove maturano in plasmacellule produttrici IgA [**Mowat AM.**, 2003]. Il maggiore numero di immunoglobuline intestinali è costituito dalle IgA secretorie (sIgA). La maggior parte delle IgA secrete è dimerica; le catene J sono presenti nella totalità delle IgA2 e nell'88% delle IgA1. Attraverso la catena J la componente secretoria lega la IgA dimerica in maniera specifica alle cripte delle cellule epiteliali e viene poi trasportata verso il lume intestinale [**MacDonald TT.**, 2003]. Le IgA secretorie non legano il complemento e quindi non iniziano un processo infiammatorio complemento-dipendente. Questo inibisce la colonizzazione e l'invasione da parte dei batteri. Le IgA possono anche inattivare i virus nelle cellule epiteliali. E' stato anche

proposto che le IgA secretorie formino un complesso con gli antigeni che viene poi intrappolato nel muco e rimosso dall'organismo [Brandtzaeg P, 1999; Mayer L., 2003].

La superficie mucosale intestinale è rivestita da un singolo strato di cellule epiteliali, gli enterociti che rappresentano un altro importante costituente cellulare del sistema immune mucosale. Le giunzioni serrate dello strato epiteliale impediscono che piccoli peptidi la attraversino, consentendo il passaggio solo agli ioni. Nei neonati e negli stati allergici e infiammati, la permeabilità sembra essere aumentata. Gli enterociti sono in grado di catturare gli antigeni alimentari mediante endocitosi e le molecole che rimangono non digerite penetrano nello spazio extracellulare mediante esocitosi. Le cellule epiteliali intestinali possono agire come APC non professionali. Esse esprimono molecole MHC e presentano gli antigeni ai linfociti T attivati. Normalmente attivano le cellule T soppressorie CD8+, avendo un ruolo nella locale immunosoppressione; secernono chemochine e citochine pro-infiammatorie in seguito allo stimolo dei patogeni. Questa attivazione può essere modificata o inibita a seguito del contatto tra le cellule epiteliali e i batteri commensali [Mayer L., 2003; Mowat AM., 2003; Chehade M, 2005]. Le cellule epiteliali catturano e trasportano le IgA secretorie verso l'intestino tramite un recettore di membrana. La componente secretoria che producono, protegge le IgA secretorie dalle proteasi del lume [Mayer L., 2003; Perdue MH., 1999]. Le citochine epiteliali che mediano i segnali alle cellule immuni sono di IL-1 α , IL-1 β , il recettore antagonista di IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , e TGF β 1- β 3 [Perdue MH., 1999].

Le cellule dendritiche sono importanti sostituenti del sistema immune intestinale. La lamina propria sotto l'epitelio contiene un gran numero di cellule dendritiche che, presumibilmente, catturano gli antigeni provenienti dalla dieta e li presentano alle cellule T. Nella lamina propria sono state riscontrate anche cellule dendritiche produttrici IL-10, che si crede abbiano un importante ruolo nell'induzione della tolleranza orale. In presenza di batteri patogeni le cellule dendritiche della lamina propria, coadiuvando l'attività esplicata dalle cellule dendritiche a livello delle placche del Peyer, catturano gli antigeni dal lume intestinale estendendo i loro dendriti tra le cellule epiteliali e partecipano all'inizio dell'immunità protettiva. Dopo essere entrate

nei linfonodi mesenterici, le cellule dendritiche incontrano i linfociti T naïve, processo, questo, che può essere amplificato da stimoli infiammatori indotti da componenti batterici [Mowat AM., 2003].

La morfologia della mucosa intestinale

L'intestino costituisce una vera e propria barriera tra l'organismo e le sostanze introdotte dall'esterno tramite l'alimentazione. Si presenta come un tubo a calibro variabile e dalle pareti flessibili. È distinto in due parti principali: intestino tenue e intestino crasso. La differenziazione è dovuta, oltre che per la forma e la lunghezza, alle diverse funzioni che queste svolgono. Nell'intestino tenue avviene l'assorbimento dei prodotti della digestione, nell'intestino crasso l'assorbimento è ormai ridotto all'acqua e ai sali minerali, mentre viene svolto il trasporto del materiale non più utilizzabile, rappresentato dalle feci. L'intestino tenue è ulteriormente suddivisibile in duodeno, digiuno e ileo, ed è costituito da quattro strati: la mucosa, la sottomucosa, la tonaca muscolare e l'avventizia. L'analisi istologica della mucosa ne evidenzia ancora una suddivisione in tre strati: un epitelio di rivestimento, una lamina propria connettivale di supporto e uno strato muscolare (la muscolaris mucosae).

Le cellule che costituiscono l'epitelio intestinale sono cellule cilindriche monostratificate, dette enterociti. L'epitelio intestinale è caratterizzato dalla presenza di numerose pieghe, dislocate lungo tutta la sua lunghezza che aumentano la superficie della mucosa, favorendo l'assorbimento di sostanze nutritive. Le pieghe sono a loro volta coperte da estroflessioni digitiformi chiamate villi intestinali, della lunghezza di circa 1mm, che servono anch'essi ad aumentare la superficie della mucosa. Sui villi sono presenti microvilli, che estendono la superficie dell'intestino tenue a circa 300 metri quadrati. Ogni villo è tappezzato da cellule la cui membrana, rivolta verso il lume interno, presenta delle sottili estroflessioni chiamate microvilli che conferiscono alla struttura il tipico aspetto dell'orletto a spazzola. La particolare

conformazione degli enterociti ha lo scopo di aumentare ulteriormente la capacità digestiva ed assorbente dell'intestino. Alla base di ogni villo sono presenti delle invaginazioni chiamate cripte di Lieberkuhn. Così come i villi, anche le cripte sono tappezzate da cellule che però, a differenza di quelle che ricoprono la parte sporgente, sono immature.

La flora intestinale.

Il tratto gastrointestinale umano ospita un complesso microbiota, che ha un forte impatto sulla salute dell'ospite. La normale popolazione batterica intestinale di un adulto comprende più di 400 specie di batteri, con una predominanza di anaerobi obbligati [Rolfé, R. D. 1997]. Il numero totale di microbi presenti in 1 grammo di contenuto intestinale varia da meno di 10^3 microbi nello stomaco a 10^4 - 10^7 microbi nel piccolo intestino, fino a 10^{12} nel colon [Goldin, B. R., 1998; Holzapfel, W. H., 1998]. Infatti il numero di microbi presenti nell'intestino (circa 10^{14}) è 10 volte superiore al numero di tutte le cellule umane [Holzapfel, W. H., 1998]. Una equilibrata flora intestinale è importante per il mantenimento di un buono stato di salute. La microflora intestinale protegge l'ospite dalla colonizzazione ad opera dei batteri ingeriti, fenomeno chiamato resistenza alla colonizzazione; molti sono i meccanismi coinvolti, incluso la competizione per i siti di adesione e per i substrati [Vollaard, E. J., 1994].

La colonizzazione dell'intestino da parte dei microorganismi è un processo che incomincia alla nascita e continua durante le successive fasi della vita fino a formare la microflora intestinale. Questo processo facilita la formazione di barriere fisiche e immunologiche tra l'ambiente e l'ospite, contribuendo al mantenimento dello stato di salute del tratto gastro-intestinale [Delcenserie V, 2008]. Inoltre durante la vita fetale l'intestino è sterile, ma subito dopo la nascita si ha una sua rapida colonizzazione da parte dei batteri e si sviluppa una microflora intestinale che può variare in rapporto al tipo di parto, all'ambiente in cui vive il neonato e all'alimentazione. Tramite il parto

cesareo viene ritardata la colonizzazione intestinale, che raggiunge in seguito gli stessi livelli di Bifidobatteri e Lattobacilli che si riscontrano nei nati con parto naturale, ma meno colonizzato da *Bacteroides fragilis* [Grönlund MM, 1999]. Comparando l'allattamento al seno con quello artificiale è emerso che indipendentemente dal tipo di alimentazione, l'intestino è principalmente composto da bifidobatteri e *E.coli*, anche se negli individui alimentati con latte materno i bifidobatteri sono in numero maggiore, mentre negli alimentati artificialmente bifidobatteri e batteroidi sono nella stessa quantità [Harmsen HJ, 2000]. Le condizioni igieniche e una dieta tendenzialmente sterile provocano atopia (la predisposizione alle allergie), influenzando sfavorevolmente la flora intestinale che stimola il GALT [Matricardi PM, 2000]. Indirettamente, quindi, il microbiota intestinale è associato alle allergie. In uno studio è stato dimostrato che i bambini allergici subiscono meno spesso la colonizzazione ad opera di lattobacilli e bifidobatteri, mentre sono più alte le conte di coliformi e *Staphylococcus aureus* rispetto ai bambini non allergici [Björkstén B, 1999]; e la composizione stessa dei bifidobatteri può risultare differente: i bambini allergici presentano in più alto numero di *Bifidobacterium adolescentis* nelle feci rispetto ai bambini sani, che invece presentano un più alto numero di *B.bifidum* [Ouwehand AC, 2001]. Inoltre gli allergici subiscono una colonizzazione di *B infantis*, *B. breve* e *B.longum* meno estesa [Ouwehand AC, 2001].

Nei modelli animali la colonizzazione intestinale gioca un ruolo nella regolazione della tolleranza orale [Maeda Y, 2001; Sudo N, 1997]. Gli effetti del microbiota intestinale si riflettono sul numero di cellule T nelle placche di Peyer, e infatti i topi germ-free mostrano un ridotto numero di cellule T, che aumenta quando i topi subiscono la colonizzazione da parte di bifidobatteri e *E.coli*, in rappresentanza di batteri Gram + e Gram -. Inoltre i topi germ-free non sviluppano tolleranza orale quando nelle placche di Peyer le cellule T sono assenti o in numero ridotto; questi dati suggeriscono che il microbiota intestinale è importante per lo sviluppo del sistema immune intestinale e della tolleranza orale.

L'intestino dunque contiene una popolazione, secondo alcuni, di migliaia di miliardi di microrganismi pari a 10^{14} , appartenenti a 17 famiglie, 45 generi e quasi 500 specie. [Probert HM, 2002;]. Tra questi, i bifidobatteri e i lattobacilli sono considerati universalmente benefici e particolarmente vantaggiosi per l'organismo ospite, favorendo la resistenza alla colonizzazione da parte di patogeni, condizionando positivamente la risposta immunitaria dell'organismo, migliorando il decorso clinico di varie condizioni patologiche, riducendo l'attività di enzimi mutageni, e svolgendo un certo effetto ipocolesterolemizzante [Miniello VL, 2001; Mattila-Sandholm T, 1999].

I Probiotici

Il termine probiotico si riferisce a microrganismi vivi che ingeriti come supplementi alimentari hanno effetti benefici sull'ospite migliorando il suo equilibrio microbico intestinale [Fuller R., 1991]. Successivamente una Commissione Europea, coordinata dall'International Life Sciences Institute ha ridefinito I probiotici come ingredienti alimentari a base di microrganismi vivi che hanno effetti benefici sulla salute [Salminen S, 1998].

Un probiotico deve essere di origine dell'ospite, non patogeno, tecnologicamente adatto per i processi industriali, inalterabili agli acidi e ai Sali biliari, aderire al tessuto epiteliale intestinale, persistere nel tratto gastrointestinale per un breve periodo, produrre sostanze antimicrobiche, modulare la risposta immune e influenzare le attività metaboliche dell'intestino [Dunne, C., 1999]. I probiotici sono costituiti essenzialmente dai cosiddetti "fermenti lattici" (Lactic Acid Bacteria), batteri anaerobi in grado di produrre acido lattico a partire da differenti substrati. Attualmente i principali probiotici utilizzati sono i batteri Lattobacilli (L.)(*acidophilus*, *bulgaricus*, *rhamnosus*, GG, *reuteri*...), lo *Streptococcus thermophilus (lactis)* e i Bifi do batteri (*Bifidobacterium bifidum, lactis, Bb12*) e il lievito *Saccharomyces boulardii*. La dose

minima efficace a scopo terapeutico è stata riportata essere 10^6 - 10^9 CFU al giorno [Lee YK, 1995] con un effetto dose-dipendente [Van Niel CW, 2002].

I lattobacilli appartengono ai batteri acido lattici che comprendono diversi gruppi di batteri gram-positivi, maggiormente rappresentati da cocci non-sporigeni, catalasi-negativi, privi di citocromi, non aerobi, ma aerotolleranti e acido-tolleranti e bastoncelli producendo acido lattico quale maggior prodotto finale della fermentazione dei carboidrati [Axelsson, L., 1998]. Per la loro particolare natura i batteri acido-lattici richiedono un ambiente di crescita molto ricco, come quello in cui ci sia materiale di decomposizione delle piante, prodotti alimentari e il tratto gastrointestinale o vaginale dei mammiferi. Il genere *Lactobacillus* è molto eterogeneo, include specie con 32-53% di G+C del DNA cromo somale arrangiato in tre gruppi in base alle differenze nel metabolismo degli zuccheri causato dalla presenza o dall'assenza del fruttosio-1,6-difosfato aldolasi e fosfochetolasi [Axelsson, L., 1998].

Sebbene possieda alcune caratteristiche in comune con i batteri acido-lattici, il genere *Bifidobacterium* è attualmente relazionato al ramo degli attinomiceti, avendo alto contenuto di G+C cromosomale [Axelsson, L., 1998]. Il metabolismo degli zuccheri dei bifidobatteri differisce da quello dei batteri acido-lattici; nei bifidobatteri manca l'aldolasi e la glucosio-6-fosfato deidrogenasi, gli zuccheri esosi sono esclusivamente degradati dalla via del fruttosio-6-fosfato caratterizzata dal fruttosio-6-fosfato fosfochetolasi [Ballongue, J. 1998]. I bifidobatteri sono membri predominanti del microbiota intestinale umano con una conta batterica di 10^9 - 10^{11} per grammo di feci, con *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, e *B. dentium* riscontrati nei campioni isolati dall'uomo [Ballongue, J., 1998].

Molti effetti positivi sono stati proposti per questi due generi di probiotici [Asahara, T., 2001; Fernandes, C. F., 1987; Fujiwara, S., 2001; Fujiwara, S., 2001; Fujiwara, S., 2001]. Il miglioramento nella diarrea è una caratteristica ben documentata di alcuni ceppi [Bennet, R. G., 1996; Kaila, M., 1996; Arvola, T. 1999; Orrhage, K., 2000; de Roos, N. 2000; Van Niel, C. W., 2002] ed in particolare è stata accertata la capacità di

Lactobacillus rhamnosus GG di accorciare la durata della fase acuta della diarrea da rotavirus [Kaila, M., 1996; de Roos, N. 2000]. E' stata anche riferita una stimolazione del sistema immunitario da parte dei probiotici [Link-Amster, H., 1994; Kishi, A., 1996; Majamaa, H., 1997; Miettinen, M., 1998; Miettinen, M., 1996; Murosaki, S., 1998; Pessi, T., 2000; Pessi, T., 1999; Maassen, C. B. M., 2000; Isolauri, E., 2000] ed è stato evidenziato che l'induzione del profilo citochinico dipende dal ceppo utilizzato [Miettinen, M., 1998; Miettinen, M., 1996; Maassen, C. B. M., 2000; Isolauri, E., 2000]. Tuttavia le proprietà dei probiotici sono considerate specifiche per ogni ceppo, e i risultati ottenuti con un ceppo non possono essere pretesi per un altro, anche se i due ceppi sono strettamente correlati [Holzapfel, W. H., 1998].

Interazioni tra probiotici e sistema immunitario

Alcuni studi hanno evidenziato l'effetto benefico dei probiotici sulle allergie, sia attraverso lo studio di allergie sperimentali, sia attraverso studi clinici sull'uomo. Le allergie sono disturbi mediati da una risposta Th2, caratterizzata da una risposta immunitaria umorale con alta produzione di anticorpi, in particolare IgE e inibizione di risposte Th1, caratterizzate, invece, da risposte immunitarie cellulari con attivazione di macrofagi e inibizione di risposte Th2. I probiotici sembrano essere in grado di sbilanciare l'equilibrio Th1/Th2 verso Th1 e capaci di inibire risposte Th2. Studi in vitro hanno mostrato che differenti lattobacilli sono in grado di stimolare la produzione di citochine Th1 (IL-12, IL-18 e IFN- γ) nei monociti e nelle cellule derivate da sangue periferico [Miettinen, M., 1998; Hesse, C., 1999]. Molti studi hanno evidenziato l'effetto positivo dei probiotici nella funzione della barriera intestinale, caratteristica che potrebbe anche spiegare l'effetto benefico sulle allergie. Una aumentata permeabilità dell'intestino permetterebbe a molti antigeni di attraversare la barriera e questo potrebbe stimolare una reazione allergica. Esperimenti condotti su giovani ratti hanno dimostrato che l'aumento di permeabilità intestinale indotto dalla somministrazione di

latte di mucca, veniva impedito quando agli animali veniva somministrato contemporaneamente LGG [Isolauri, E., 1993]. Inoltre è stato dimostrato che i probiotici stimolano la produzione di IgA sia nel compartimento sistemico che mucosale [Tejada-Simon, M. V., 1999]. Gli effetti benefici osservati in alcuni modelli potrebbero essere il risultato della competizione tra probiotici e patogeni per i siti di legame e i nutrienti nell'intestino a seguito della produzione di batteriocine. Inoltre molti ceppi probiotici sono in grado di stimolare l'immunità cellulare, evidenziata dalla produzione di citochine pro-infiammatorie quali TNF- α IL-1 β e IL-6 [He, F., 2002; Miettinen, M., 1996], dall'aumentata fagocitosi [Perdigon, G., 1988] e dall'attivazione dell'attività delle cellule natural killer [Matsuzaki, T., 2000].

L'interazione tra i probiotici e gli enterociti è importante nella produzione di citochine e chemochine secrete dalle cellule epiteliali. Infatti è stato dimostrato che alcuni probiotici possono modulare l'espressione in vivo di molecole pro-infiammatorie e anti-infiammatorie e questo dipende dal ceppo utilizzato. Per esempio *Lactobacillus sakei* induce l'espressione di IL-1 β , IL-8 e TNF- α , mentre *Lactobacillus johnsonii* stimola la produzione di TGF- β nelle cellule Caco2. Questo processo sembra richiedere l'interazione tra le cellule epiteliali e i leucociti che si trovano al di sotto di esse. [Haller D, 2000].

Esistono dunque diversi modi tramite cui i probiotici impediscono le infezioni (fig. 2):

1. Inibiscono l'adesione dei patogeni all'epitelio in maniera non specifica o competono per specifici recettori e nutrienti;
2. Producono agenti antimicrobici contro i patogeni;
3. Inducono la produzione di mucina (MUC 2 e 3) nelle cellule epiteliali;
4. Rinforzano la barriera mucosale promuovendo la rigenerazione delle cellule epiteliali e riducendo la permeabilità;

5. Modulano il sistema immunitario attraverso le cellule presentanti l'antigene (macrofagi e cellule dendritiche);
6. Stimolano le cellule immuni e le cellule epiteliali a produrre citochine infiammatorie, amplificando le risposte immuni cellulo-mediate e l'attivazione di cellule T citotossiche, fagociti e cellule NK;
7. Aumentano la proliferazione delle cellule B attraverso l'induzione di citochine Th2, che si dirigono verso gli organi linfatici secondari nel MALT e differenziano in plasmacellule produttrici immunoglobuline e possono ritornare al GALT;
8. Inducono la produzione di anticorpi specifici quali le IgA secretorie.

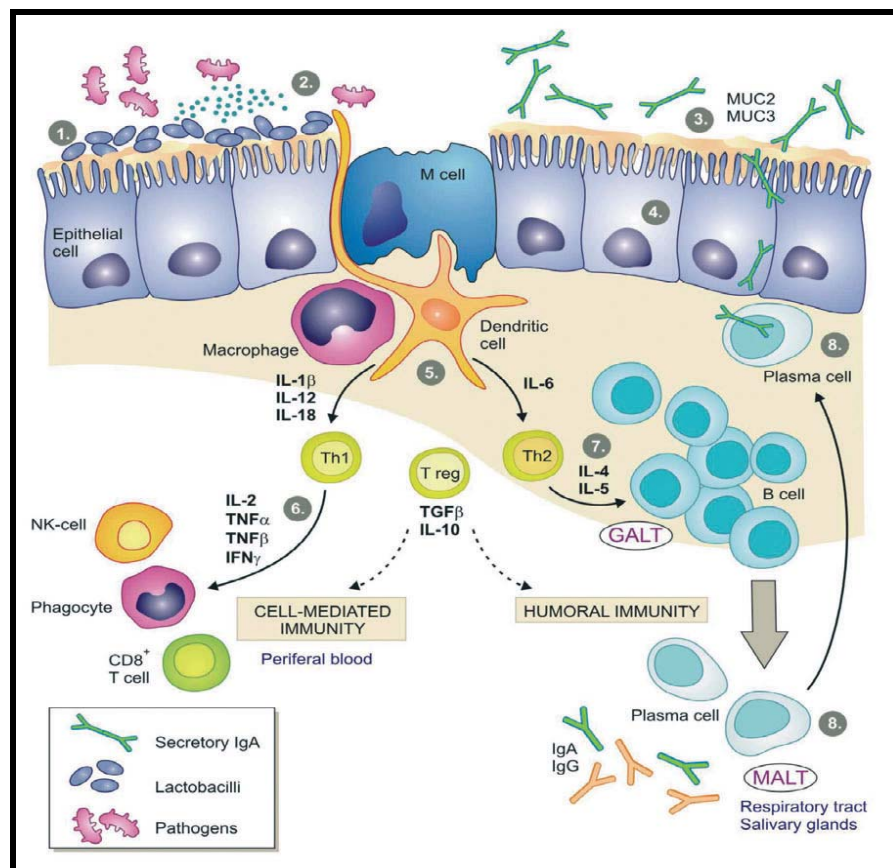


Figura 6. I probiotici possono prevenire le infezioni attraverso vari meccanismi (illustrazione di Sole Latti – fonte: dalla rete)

Effetti immunologici in modelli animali

In due studi separati, condotti su un modello murino di allergia alimentare, la somministrazione intragastrica di *L.casei* Shirota e *L.plantarum* L-137 uccisi al calore, induce in entrambi i casi la produzione di IL-12 [Murosaki S, 1998; Shida K, 2002] e contemporaneamente inibisce la produzione di IgE specifiche per l'antigene [Shida K, 2002]. In un altro studio sono stati utilizzati splenociti murini stimolati con OVA, e ristimolati *in vitro* con OVA e con *L.casei*; il risultato ottenuto è stato l'aumento della produzione di IFN- γ e IL-12, l'inibizione della IL-4 e IL-5 e la soppressione di IgE secretorie specifiche per l'antigene da parte degli splenociti stimolati con OVA [Shida K, 1998].

I probiotici possono anche avere effetto sul sistema delle cellule T regolatorie. È stato, infatti, dimostrato che in cellule T CD4+ derivate da topi BALB/c naïve, coltivate con gli splenociti, *L. paracasei* inibisce la produzione di citochine Th1 e Th2, mantenendo la produzione di IL-1 e inducendo la produzione di TGF- β dalle cellule T; questo suggerisce lo sviluppo di cellule T regolatorie [von der Weid T, 2001]. In un altro studio condotto su un modello murino di colite *L. salivarius* e *B. infantis* alleviano l'infiammazione intestinale in maniera maggiore rispetto al placebo; *Bifidobacterium* riduce anche la produzione di IFN- γ , TNF- α e IL-12 negli splenociti stimolati *in vitro*. Con l'uso dei lattobacilli, la riduzione diventa evidente solo per l'IFN- γ e la produzione di TGF- β viene mantenuta in tutti i gruppi. Nelle restanti cellule delle PP, la secrezione di IFN- γ e TNF- α viene attenuata dai ceppi di bifidobatteri [McCarthy J, 2003]. In un modello murino che ricorda la dermatite da contatto, la somministrazione orale di *L.casei* riduce l'infiammazione cutanea inibendo l'espansione delle cellule T effettrici CD8+ produttori di IFN- γ [Chapat L, 2004]. Questa soppressione richiede la presenza di cellule T CD4+, probabilmente cellule regolatorie. In un altro studio LGG riduce la secrezione *in vitro* di TNF- α da parte dei macrofagi murini attivati [Peña JA., 2003].

Nella produzione di citochine esistono delle differenze che sono specifiche per i ceppi di probiotici. [Christensen HR, 2002]. I bifidobatteri, isolati dalle feci di lattanti allergici, inducono in maniera forte i macrofagi a produrre IL-1, IL-6 e TNF- α , e in maniera minore IL-10, rispetto a quanto riportato per i bifidobatteri isolati dalle feci degli adulti, dei bambini sani o isolati dai prodotti caseari [He F, 2002].

SCOPO DEL LAVORO

E' noto che i probiotici hanno molteplici effetti benefici sulla salute dell'ospite, interagendo con il sistema immune attraverso vari meccanismi, tra cui l'inibizione dell'adesione dei patogeni all'epitelio, la produzione di anticorpi specifici e la modulazione del sistema immune tramite le APC.

L'attività sperimentale è stata rivolta a caratterizzare il potenziale immunomodulatorio di batteri probiotici utilizzando un modello *in vitro* di immunità innata, costituito dalle cellule dendritiche (DC), e un modello *in vivo* di immunità specifica, il topo transgenico DQ8 (esprime la molecola umana HLA-DQ8), che presenta ipersensibilità intestinale al glutine del grano.

Il lavoro sperimentale è stato organizzato utilizzando questo modello murino per valutare l'effetto dei probiotici sull'immunità intestinale. Uno dei probiotici testati, *L.casei*, che ha mostrato i maggiori effetti immunomodulatori, è stato utilizzato in fasi successive del lavoro per studi più approfonditi. In particolare nel modello murino sensibilizzato con la gliadina, è stato indagato l'effetto della somministrazione di *L.casei* contemporaneamente alla somministrazione di indometacina, un farmaco anti infiammatorio non steroideo, in grado di bloccare le ciclo-ossigenasi e aumentare il danno mucosale in soggetti con infiammazione intestinale.

I risultati di questo studio hanno evidenziato che i probiotici testati inducono la maturazione delle cellule dendritiche nella fase sperimentale *in vitro*, e aumentano la produzione di citochine infiammatorie nel modello murino. Di particolare interesse si è dimostrato *L.casei*, il quale amplifica l'effetto dell'adiuvante mucosale e, utilizzato in un modello di enteropatia intestinale, non ne aumenta il danno.

La ricerca effettuata apre anche prospettive applicative, offrendo la possibilità di utilizzare *L.casei* come co-adiuvante mucosale di vaccini, e il modello murino così sviluppato per indagare la patogenesi della malattia celiaca e per analizzare strategie immunomodulatorie alternative alla dieta senza glutine.

Sezione 2

MATERIALI E METODI

Preparazione dell'antigene

Dalla preparazione cruda SIGMA di gliadina, 10 grammi sono sottoposti ad estrazione con 80 ml di etanolo 70% mediante agitazione continua per 50 minuti a temperatura ambiente. La sospensione viene centrifugata per 20 minuti a 15000 g a temperatura ambiente; il supernatante viene recuperato e privato della quota etanolica con l'ausilio del rotavapor e poi congelato rapidamente e liofilizzato. 100 milligrammi della gliadina così ottenuta vengono risospesi in 1 ml di carbonato d'ammonio e urea (NH_4HCO_3 0,1M, pH 7,9; urea 2M), e viene aggiunta α -chimotripsina in un rapporto substrato: enzima pari a 200:1. La digestione viene effettuata a 37°C per 24 ore e bloccata in acqua bollente per 5 minuti; dopodiché la sospensione viene centrifugata per 10 minuti a 4000 g ed il supernatante privato dell'urea mediante una colonna desalificante (BioRad PD10). Il digesto chimotriptico così ottenuto viene conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Modello animale

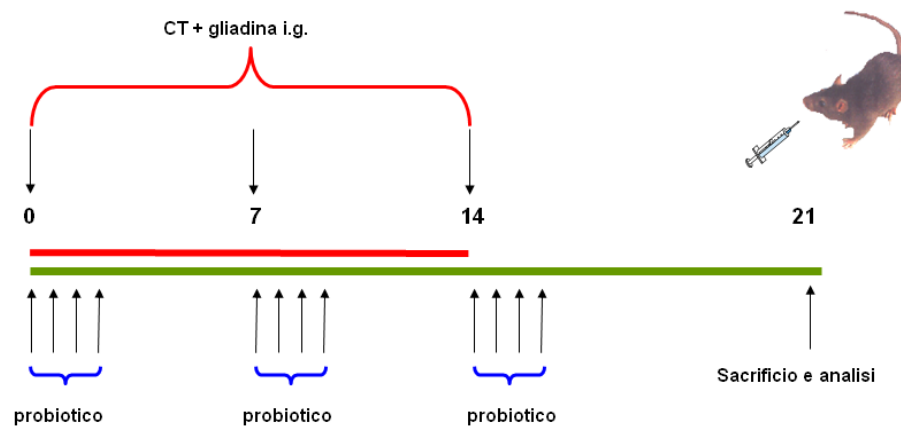
Il topo transgenico HLA-DQ8, è stato originato da topi H-1AB0, deficienti della classe II [Cheng S, 1996]. Questo modello di topo transgenico DQ8 è stato ottenuto con l'introduzione di cosmidi H11A e X10A, contenenti rispettivamente i geni HLA-DQA*0301 e HLA-DQB*0302 in topi (B10 x SWR) particolarmente sensibili nel generare transgenici, che sono stati incrociati con topi H-2A β^0 (A β^0) privi di molecole di classe II endogene (Cheng S,1996). Gli animali vengono allevati presso lo stabulario dell'Istituto di Scienze dell'Alimentazione, CNR, Avellino e alimentati con una dieta priva di glutine. Vengono utilizzati solo topi di 6-12 settimane di seconda o successiva generazione, al fine di disporre di un modello animale che non abbia sviluppato tolleranza orale nei riguardi della gliadina.

Generazione e trattamento delle cellule dendritiche derivate da midollo osseo

Secondo il protocollo di Lutz (Lutz MB et al 1999), le cellule dendritiche vengono prelevate dalle ossa lunghe (tibia e femore) di topi transgenici DQ8 di 6-12 settimane. Vengono risospese ad una concentrazione di 2×10^6 in un volume di 10 ml di RPMI supplementato con FCS 10%, glutamina 2 mM, antibiotici (100 U/ml di penicillina e 100 $\mu\text{g/ml}$ di streptomina), amminoacidi non essenziali 0.1 mM, Sodio piruvato 0.1 mM, 2-mercaptoetanololo 50 μM e 10% di FCS inattivato (56°C per 30') e GM-CSF 20 ng/ml e poi seminate in piastre da 10 mm e incubate a 37°C con 5% CO_2 . Al giorno 3 vengono aggiunti 10 ml del mezzo di coltura (supplementato come sopra) e al giorno 7 la coltura viene rinfrescata prelevando 10 ml ed aggiungendo 10 ml di mezzo di coltura (supplementato come sopra). Al giorno 8 le cellule dendritiche non aderenti vengono delicatamente raccolte. Aliquote di 1×10^6 cellule per ml vengono poste in piastre da 24 pozzetti, cui vengono aggiunti il lipopolisaccaride batterico (LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$) e i probiotici (1×10^5 CFU) per 48 ore. Il test viene effettuato in duplicato. In alcuni esperimenti 24 ore prima della fine dell'incubazione viene aggiunto ai probiotici anche LPS (1 $\mu\text{g/ml}$).

Trattamento *in vivo*.

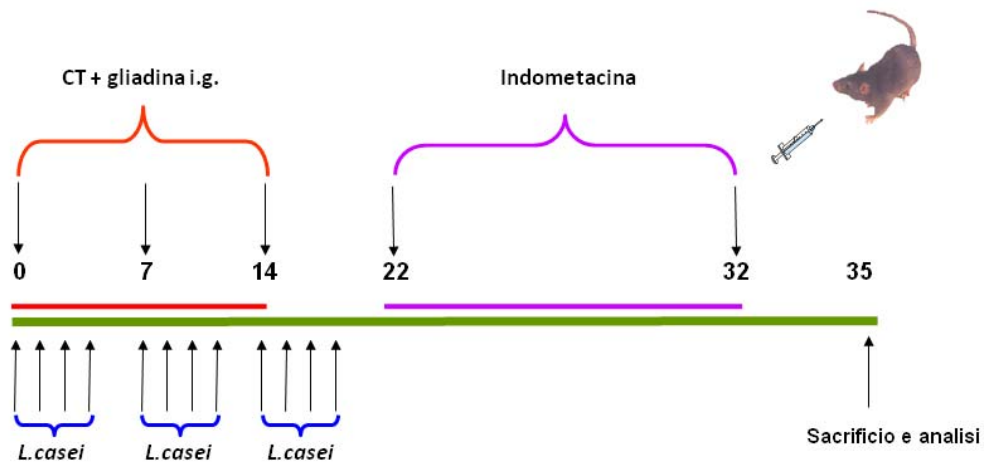
La strategia di immunizzazione mucosale dei topi transgenici DQ8 è stata eseguita somministrando per via intragastrica il digesto chimotriptico della gliadina (500 $\mu\text{g/dose}$), insieme con la Tossina Colerica (CT) come adiuvante mucosale (25 $\mu\text{g/dose}$), una volta alla settimana, nei giorni 0, 7 e 14, per tre settimane. Quando previsto, il probiotico (1×10^{10} CFU/dose) è stato co-somministrato durante l'immunizzazione e poi da solo per i successivi tre giorni, per tre settimane. Al giorno 21 gli animali sono stati sacrificati e gli organi interni prelevati per le analisi *in vitro*.



Schematizzazione del trattamento in vivo per l'induzione di una risposta immune specifica per la gliadina nel topo transgenico DQ8.

Preparazione e somministrazione dell'indometacina

Alla strategia di immunizzazione illustrata in precedenza è stata aggiunta la somministrazione di indometacina. La soluzione madre è stata preparata sciogliendo l'indometacina in etanolo puro ad una concentrazione di 3 mg/ml. La soluzione è stata poi aggiunta all'acqua di abbeveraggio degli animali fino ad una concentrazione finale di 3 mg/10 ml a partire dal giorno 22 dall'inizio della sperimentazione. L'aggiunta è stata fatta 3 volte alla settimana per un periodo complessivo di 13 giorni. Per gli animali di controllo è stata preparata una soluzione di etanolo che è stata poi aggiunta all'acqua con le stesse modalità e per lo stesso tempo dell'indometacina. Al giorno 35 gli animali sono stati sacrificati e gli organi interni prelevati per le analisi in vitro.



Schematizzazione del trattamento in vivo della somministrazione di indometacina in aggiunta al protocollo sperimentale.

Probiotici: ceppi e condizioni di coltura.

I probiotici utilizzati sono stati:

- *Lactobacillus casei* ATCC 9595;
- *Lactobacillus fermentum* (LTR 132).
- *Bifidobacterium lactis* RDLS-NCC 2818.;
- *Lactobacillus paracasei* (isolato Lavermicocca ISPA CNR Bari);
- *Lactobacillus plantarum* (isolato Lavermicocca ISPA CNR Bari)

I ceppi batterici sono stati coltivati nel terreno specifico deMan, Ragosa e Sharp (MRS) in condizioni di microaerofilia

Per gli esperimenti *in vitro* le cellule batteriche sono state raccolte nella fase esponenziale della crescita; sono state contate utilizzando una camera conta globuli, poi centrifugate a 6000 g per 10 minuti, lavate 2 volte in PBS sterile e irradiate per 1 h e 30 minuti. Infine sono state aggiunte alle cellule dendritiche in numero 1×10^5 CFU per punto sperimentale.

Per gli esperimenti *in vivo*, le cellule batteriche sono state raccolte nella fase stazionaria della crescita; sono state contate utilizzando una camera conta globuli, poi centrifugate a 6000 g per 10 minuti e lavate 2 volte in PBS sterile. Infine 1×10^{10} CFU/dose sono state somministrate per via intragastrica.

Test di proliferazione cellulare

La milza e i linfonodi mesenterici vengono prelevati al momento del sacrificio, passati su un setaccio (trama da 50 mesh) e schiacciati con un pestello, in presenza di mezzo completo, per liberare le cellule e allontanare i tessuti. Le cellule vengono poi raccolte, lavate e contate utilizzando un colorante vitale, la Nigrosina all'1% (diluata 1:1) e alla fine risospese ad una concentrazione finale di 5×10^6 cellule/ml. Le cellule (100 μ l di cellule linfonodali o spleniche alla concentrazione di 5×10^6 /ml) vengono incubate per 72 ore a 37°C con 5% CO₂, in presenza di solo mezzo e in presenza di mezzo più l'antigene nelle seguenti condizioni:

- 100 μ l di solo mezzo completo;
- 100 μ l di mezzo completo con gliadina ad una concentrazione finale di 200 μ g /ml

La risposta cellulo-mediata viene valutata attraverso un test di proliferazione *in vitro* delle cellule coltivate, col quale viene determinata la quantità di [³H]-timidina incorporata nel DNA neo-sintetizzato dalle cellule stimolate: tale incorporazione di timidina fornisce una misura quantitativa del tasso di sintesi del DNA, direttamente proporzionale al tasso di divisione cellulare. La [³H]-timidina (0.5 μ Ci/pozzetto) viene aggiunta nelle ultime 18 –20 ore.

Al termine del tempo di incubazione le cellule vengono trasferite su filtro, viene aggiunto il liquido di scintillazione (Microscint TH 40, A Packard Bioscience Company, 40 μ l/pozzetto) ed effettuata la conta al β -scintillatore TopCount. I dati sono espressi

come indice medio di stimolazione SI (cpm cellule coltivate con antigene / cpm cellule coltivate con solo mezzo).

Valutazione del profilo citochinico

Le cellule derivate dalla milza e dai linfonodi mesenterici, coltivate ad una concentrazione di 5×10^6 /ml in presenza di solo mezzo o di mezzo più gliadina ad una concentrazione di 200 µg /ml, vengono incubate per 72 ore a 37°C con 5% CO₂. Al termine del tempo di incubazione i supernatanti delle cellule vengono raccolti e analizzati mediante test ELISA per la valutazione del pattern citochinico.

Il protocollo per il test ELISA utilizzato è stato il seguente: 100 µl di tampone carbonato in cui è stato diluito l'anticorpo di cattura, vengono distribuiti in una piastra NUNC da 96 pozzetti e incubata O/N in camera umida a 4°C. Il giorno dopo, l'anticorpo di cattura viene rimosso, la piastra lavata 3 volte con un tampone fosfato supplementato con Tween-20 allo 0,05% (PBS-Tween 0,05%) e vengono aliquotati 100 µl di una soluzione di BSA al 2% e la piastra viene incubata per 2 ore a temperatura ambiente; successivamente 100 µl di ciascun campione e gli standard delle differenti citochine vengono incubati O/N a 4°C. Alla fine dell'incubazione 100 µl di anticorpo coniugato con la biotina, opportunamente diluiti in PBS-Tween 0,05% e BSA 2% vengono incubati per 2 ore a temperatura ambiente. Dopodiché la piastra viene lavata 3 volte con PBS-Tween 0,05% e poi 100 µl di streptavidina perossidata vengono distribuiti; la piastra viene incubata per 1 ora a temperatura ambiente. Alla fine dell'incubazione la piastra viene lavata 3 volte con PBS-Tween 0,05% e, infine, 100 µl di una soluzione costituita da 63 mM Na₂HPO₄ e 29 mM acido citrico (pH 6,0) contenente 0,66 mg/ml di ortofenildiammina/HCl e 0,05% di H₂O₂ vengono aggiunti e la piastra viene incubata al buio per 30 minuti. L'assorbanza viene letta a 405 nm e la concentrazione delle citochine viene calcolata sulla base della curva standard.

Valutazione fenotipica delle cellule dendritiche

Per valutare l'espressione di molecole costimolatorie, quali il CD80 e il CD86 e di molecole accessorie, quali il CD11c, è stata utilizzata l'analisi citofluorimetrica (FACS). Le cellule dendritiche, coltivate secondo quanto descritto precedentemente, sono state raccolte e lavate in PBS, supplementato con FCS al 2% e risospese nello stesso tampone. Le cellule sono state poi incubate al buio, con differenti anticorpi monoclonali, coniugati con fluoresceina isotiocianato (FITC anti-CD80), con la ficoeritrina (PE anti-CD11c) e con l'allofococianina (APC anti-CD86), per 30 minuti a 4°C. Al termine del periodo di incubazione, le cellule sono state lavate con PBS e analizzate mediante citofluorimetro.

Valutazioni sul piccolo intestino.

Frammenti di piccolo intestino sono stati raccolti per le misurazioni immunomorfometriche, per le analisi della prostaglandina E₂ (PGE₂) delle metalloproteasi di matrice (MMP) e dell' RNA. Le velocità proliferative delle cellule delle cripte sono state determinate somministrando la bromodeossiridina (BrdU) ad una concentrazione 100 mg/Kg per via intraperitoneale, 1 ora prima del sacrificio.

Morfometria e immunoistochimica.

Allo scopo di valutare le alterazioni dell'architettura mucosale, sono state eseguite misurazioni dell'altezza dei villi e profondità delle cripte.

Campioni del tratto prossimale di digiuno sono stati raccolti al momento del sacrificio. Frammenti di circa 0,3 mm, osservati allo stereomicroscopio, sono stati aperti, e inclusi utilizzando Killik (cryostst embeading medium Bio-Optica) come mezzo di inclusione e, opportunamente orientati, sono stati congelati in azoto liquido. Sezioni congelate di 5 µm sono state ottenute mediante taglio al criostato e fatte asciugare a temperatura ambiente per 24 ore; i campioni sono stati incubati al buio per 20 minuti

con To Pro 3 (Molecular Probes 1:200) per contrastare i nuclei. La valutazione dell'altezza dei villi e della profondità delle cripte è stata effettuata al microscopio confocale Leica SP (Leica Microsystem Milano Italia) mediante l'ausilio un programma di analisi d'immagine. Il valore medio è stato calcolato effettuando 15 misurazioni per ciascun campione, eseguite in cieco da due operatori.

Utilizzando tecniche di immunoistochimica, abbiamo valutato il numero di linfociti T infiltranti l'epitelio e l'espressione del recettore per l'IL-2 presente sulle cellule mononucleate della lamina propria immunologicamente attivate, e il recettore del F4/80 presente sui macrofagi. Al fine di evidenziare segni di iperplasia delle cripte di Lieberkühn, dovuta all'aumentato numero delle cellule in divisione mitotica, abbiamo valutato l'espressione della bromodeossiridina (BrdU), che viene incorporata nel DNA al posto della timidina durante la fase S del ciclo cellulare.

Analisi dell'apoptosi

Il fenomeno dell'apoptosi è stato indagato con la tecnica TUNEL. La divisione del DNA durante l'apoptosi, può produrre sia filamenti a basso peso molecolare, sia singoli filamenti interrotti (nicks) ad alto peso molecolare. Con la tecnica Tunel questi filamenti interrotti sono identificati marcando i 3'-OH terminali liberi con nucleotidi modificati, in una reazione enzimatica. In particolare, l'enzima terminal deossinucleotidil transferasi (TdT) catalizza la polimerizzazione dei nucleotidi fluoresceinati all'estremità 3'-OH liberi di DNA. I corpi apoptotici sono così osservabili al microscopio in fluorescenza.

Sezioni di 7 micron ottenute con il criostato sono state fatte asciugare per 24 ore a temperatura ambiente e poi fissate in paraformaldeide al 4% per 20 minuti, lavate con tampone PBS e permeabilizzate con una soluzione Triton X100 allo 0,1% + Sodio citrato allo 0,1% per 2 minuti in ghiaccio. Le sezioni sono state poi incubate con una miscela costituita dall'enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl-transferasi) e nucleotidi coniugati con Texas Red (Kit Roche). Dopo un'ora d'incubazione a 37°C in

una camera umida le sezioni sono state incubate per 20 minuti con TO PRO 3 (Molecular Probes 1: 200), per evidenziare il contrasto nucleare.

La densità delle cellule TUNEL+ è stata espressa contando il numero di cellule positive per mm² di lamina propria al microscopio confocale utilizzando il software d'analisi d'immagine Image Pro Plus. Il numero delle cellule in apoptosi è stato calcolato come cellule TUNEL+ per mm² di lamina propria.

Valutazioni CD3, CD25 e F4/80

Dai frammenti del piccolo intestino congelati in azoto liquido, abbiamo ottenuto, mediante taglio al criostato, sezioni di 5µm, che sono state asciugate a temperatura ambiente per 24 ore e successivamente fissate con acetone per 30 minuti. Le sezioni sono state quindi incubate con PBS supplementato con 1% di albumina di siero bovina (BSA - Sigma) per 30 minuti. Tutte le sezioni sono state incubate per 1 ora, separatamente con i differenti anticorpi ottenuti in ratto: contro il CD3 per marcare i linfociti T (Serotec 1:100), contro il CD25 (Serotec 1:500) per marcare il recettore dell'IL-2, e contro l'F4/80 (Oxford Biomarketing 1:100) per marcare i macrofagi. Successivamente i campioni sono stati incubati al buio per 40 minuti con siero di capra anti-ratto, coniugato con fluoresceina (Invitrogen 1:500). Infine le sezioni sono state trattate con ToPro3 (Molecular Probes 1:200) per evidenziare il contrasto nucleare. Ciascun passaggio è stato intervallato da lavaggi con tampone PBS (Phosphate buffered saline Sigma) e tutte le incubazioni sono avvenute in camera umida a temperatura ambiente.

La densità delle cellule CD3+, infiltranti l'epitelio, è stata espressa contando il numero di cellule positive per mm di epitelio. Il numero delle cellule esprimenti il recettore dell'IL-2 e del F480 è stata calcolato valutando le cellule CD25+ e F480+ per mm² di lamina propria. Tali conte sono state effettuate al microscopio confocale Leica SP (Leica Microsystem Milano Italia) con l'ausilio di un programma di analisi

d'immagine (ImageProPlus). Per ciascun marcatore, il valore medio è stato calcolato effettuando 15 misurazioni per ciascun campione eseguite in cieco.

Esperimenti di doppia colorazione sono stati eseguiti per evidenziare i linfociti T attivati (CD25+CD3+) o i macrofagi attivati (CD25+F480+). Le sezioni ottenute mediante taglio al criostato sono state incubate per 1 ora con una miscela di anticorpi costituita da un anticorpo coniugato con la biotina e rivolto contro il CD25 (Rat a Ms IgM biotinilato BD Pharmingen 1:25) insieme con un anticorpo rivolto contro il CD3 (Rat anti Mouse IgG_{2a} Serotec 1:100), o con un anticorpo contro l'F4/80 (Rat anti Mouse IgG_{2b} Oxford Biomarketing 1:100). Al termine dell'incubazione con la miscela di anticorpi primari, le sezioni sono state incubate al buio per 40 minuti, ognuna con un'altra miscela costituita da un siero di capra anti-ratto, coniugato con fluoresceina (Invitrogen, 1:500) e dalla streptavidina coniugata con R-ficoeritrina RPE (Dako 1:10). Infine, tutte le sezioni sono state contrastate con il colorante nucleare To-Pro3 (Molecular Probes 1:200), montate con tampone fosfato (PBS) e glicerolo in rapporto 1:1 (Sigma 1:1), e osservate al microscopio confocale Leica. Tutti gli anticorpi primari erano ottenuti in ratto. Il numero delle cellule doppie positive CD25+CD3+ e CD25+F480+ è stato valutato all'interno di un'area di 1 mm² di lamina propria, utilizzando un programma di analisi d'immagine (ImageProPlus). Il numero ottenuto è la media di 15 conte per ciascun campione fatta in cieco.

Per la valutazione della cattura della bromodeossiridina (BrdU), incorporata nel DNA al posto della timidina durante la fase S del ciclo cellulare, gli animali sono stati sottoposti, 1 ora prima del sacrificio, ad un'iniezione intraperitoneale di bromodeossiridina, ad una concentrazione 100 mg/Kg per via intraperitoneale. Al momento del sacrificio un frammento del digiuno prossimale è stato fissato in Metacarnoy (metanolo 60%, clorofirmio 30%, acido acetico ghiaccio 10% Carlo Erba) per 6 ore. Dopo la fissazione, i pezzi sono stati inclusi in paraffina, secondo il seguente protocollo:

- Alcool 70% (Carlo Erba) per 30 minuti
- Alcool 100% (Carlo Erba) 2 cambi per 30 minuti

- Xilolo (Carlo Erba) 2 cambi per 30 minuti
- Xilolo-paraffina 3 ore in stufa a 50°C
- Paraffina in over-nigth in stufa a 50°C
- Inclusione in paraffina.

Sezioni di 6 µm, ottenute mediante taglio al microtomo, sono state distese sulla superficie dell'acqua a 37° C raccolte su vetrini, che sono poi stati lasciati ad asciugare su una piastra termostata a 37°C per tutta la notte. I vetrini, quindi, sono stati privati della paraffina attraverso le seguenti fasi:

- Bio-Clear (Bio-Optica) 2 cambi di 30 minuti ciascuno
- Alcool 100% (Carlo Erba) 2 cambi di 30 minuti ciascuno
- Alcool 70% (Carlo Erba) 2 cambi di 30 minuti ciascuno
- Reidratati in acqua 20 minuti

Le sezioni sono state quindi incubate per 24 ore a 4°C, con un anticorpo primario anti-bromodeossiridina, ottenuto in pecora (Biodesign 1:500), successivamente incubate per 45 minuti con l'anticorpo secondario coniugato con la biotina (Vector 1:500) ed infine incubate con la streptavidina perossidata (Dako 1:300) per 30 minuti. La reazione immune è stata evidenziata utilizzando la DAB come substrato della perossidasi. Infine, le sezioni sono state contrastate, disidratate e montate secondo le seguenti fasi:

- Alcool 70% (Carlo Erba) 30 minuti
- Alcool 100% (Carlo Erba) 2 cambi per 30 minuti
- Bio Clear (Bio-Optica) 2 cambi per 15 minuti
- Montaggio con DPX

L'espressione della bromodossuridina è stata valutata contando il numero di cellule positive per ciascuna cripta, da cui poi è stata fatta la media, valutando 25 conte per ciascun campione fatta in cieco. Il valore medio è stato calcolato da 15 misurazioni per ciascun campione eseguite in cieco.

Dosaggio della prostaglandina E₂

La concentrazione della prostaglandine E₂ (PGE₂) è stata misurata in campioni di tessuto congelati, utilizzando un kit per saggio immunoenzimatico (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Real Time PCR Array

Un RT² Profiler™ Mouse Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array è stato utilizzato per esaminare simultaneamente il livello dei trascritti di 89 geni, incluso i geni costitutivi per la normalizzazione. L'analisi è stata effettuata in piastre da 96 pozzetti secondo il protocollo fornito (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD). La miscela di reazione conteneva 1x SuperArray's RT² Real-Time™ SYBR Green PCR Master Mix e una quantità diluita di cDNA corrispondente a 1 µg di RNA. Dopo l'incubazione iniziale di 10 minuti a 95°C, sono stati effettuati 40 cicli a 95°C per 15'' (fase denaturante), e a 60°C per 1' (fase allineamento ed estensione) con una singola misura di fluorescenza SYBR green I alla fine di ciascun ciclo. I dati sono stati analizzati utilizzando il metodo $\Delta\Delta Ct$ [Livak KJ, 2001]

Dosaggio dell'attività delle MMP

L'attività delle MMP è stata misurata mediante uno zimogramma effettuato in condizioni non-riducenti secondo il protocollo di Kleiner e Stetler-Stevenson (Kleiner, D. E., and W. G. Stetler-Stevenson. 1994. Quantitative zymography: detection of

picogram quantities of gelatinases. Anal. Biochem 218:325–329). In particolare i campioni congelati prelevati dal piccolo intestino sono stati frammentati meccanicamente nel tampone di estrazione (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.2 mM NaN₃ contenente 10 mg/ml leupeptina, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoruro, 5 mg/ml aprotinina e 10 mg/ml pepstatin A), 0.01% Triton X-100). Dopo centrifugazione i supernatanti sono stati raccolti e conservati in aliquote a -80°C. Uguali quantità di proteina da ciascun campione (9 mg) sono state frazionate mediante elettroforesi non riducente su un gel di poliacrilamide (10%) denaturante contenente 1 mg/ml di substrato (gelatina per le gelatinosi, MMP2 e MMP9 o α caseina per stromelinasasi ad es, MMP1 e MMP7). Al termine del frazionamento i gel sono stati lavati 3 volte con un tampone **A** (50 mM Tris-HCl; pH 7.5 contenente 5 mM CaCl₂ e 2.5% Triton X-100) per 15 minuti, per rimuovere l'SDS prima di essere incubati nel tampone di sviluppo (tampone **A** senza Triton X-100) per 18 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione i gel sono stati colorati con blu di Coomassie e le zone chiare di digestione sono servite per visualizzare l'attività delle MMP. La identificazione delle diverse MMPs è stata effettuata calcolando il loro peso molecolare sulla base della migrazione di proteine standard in un gel di poliacrilamide (10%).

Analisi statistica

Le differenze tra le medie nei vari trattamenti nei test proliferative, nell'espressione delle citochine e nei dati morfologici sono state determinate utilizzando il test ANOVA. Differenze significative sono state identificate mediante analisi post-hoc con il test Tukey. Per comparare le analisi della PCR array è stato utilizzato il t-test di Student. Per entrambi i test sono state considerate significative, le differenze con un valore di $P < 0,05$.

Sezione 3

RISULTATI

L'immunizzazione mucosale stimola una risposta Th1 specifica per la gliadina nel topo DQ8.

Il modello della sperimentazione *in vivo*, utilizzato per sviluppare una ipersensibilità intestinale specifica per la gliadina, è stato il topo transgenico HLA-DQ8, proveniente da una colonia mantenuta a dieta senza glutine. Dati precedenti indicano che la sensibilità al glutine in questi topi è conseguenza della specifica espressione dell'eterodimero DQ8 [Black KE, 2002]. La nostra strategia di immunizzazione prevede la somministrazione intragastrica di un digesto chimotriptico della gliadina (ct-gliadina insieme con la tossina colerica (CT) come adiuvante mucosale.

In seguito alla somministrazione di dosi multiple di *L.casei* insieme con la tossina colerica e il digesto chimotriptico della gliadina, gli splenociti e i linfonodi mesenterici sono stati isolati e stimolati *in vitro* con ct-gliadina per l'analisi proliferativa; i valori sono espressi come indice di stimolazione. In questo modello sperimentale la gliadina da sola non stimola una risposta proliferativa antigene-specifica, né tantomeno la produzione di citochine. Infatti come si può notare dalla figura 1 l'indice di stimolazione è inferiore a 2; in presenza dell'adiuvante mucosale, invece, il trattamento induce una significativa risposta immune cellulo-mediata nei confronti della gliadina. (fig 1).

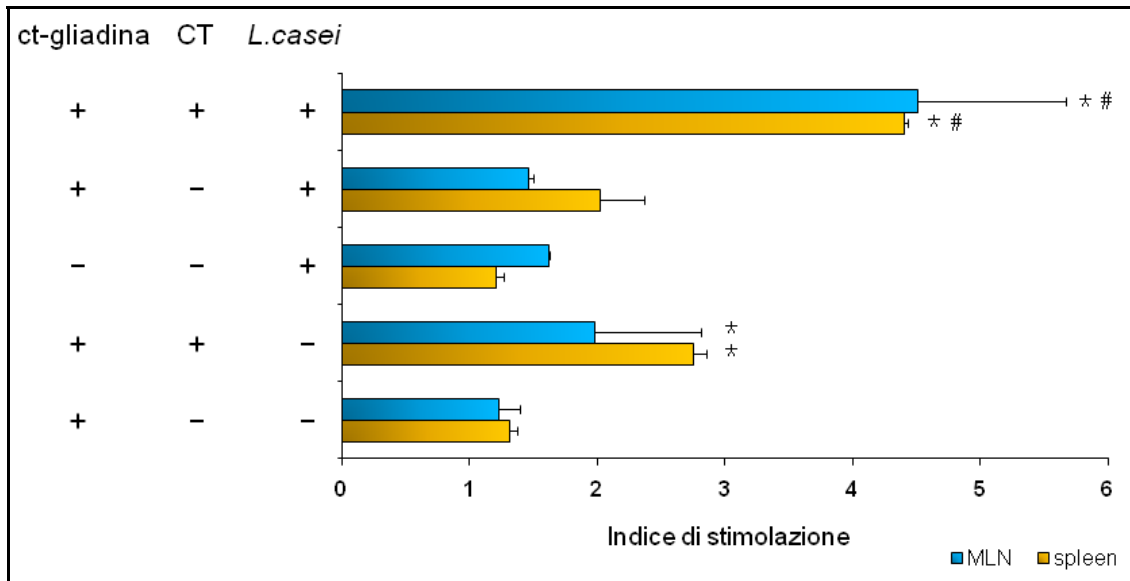


Figura 1: Effetto del *Lactobacillus casei* sulla risposta proliferativa in vitro su splenociti e linfonodi mesenterici isolati da topi sensibilizzati.

La barra dell'errore rappresenta la media \pm la deviazione standard di sei animali e sono rappresentativi di tre esperimenti differenti.

*: differenza statistica con il controllo negativo (solo ct-gliadina);

#: differenza statistica rispetto agli animali immunizzati ct-gliadina + CT)

I dati mostrati in fig.2 evidenziano che la risposta ottenuta con la somministrazione dell'adiuvante mucosale risulta caratterizzata essenzialmente dalla produzione di interferone- γ , sia nel compartimento sistemico (milza) che mucosale (linfonodi mesenterici) La figura 2 mostra anche che negli stessi compartimenti sono stati riscontrati bassi livelli di IL-10, una citochina inducibile, mentre non è stato possibile rilevare i livelli di IL-4 e TNF- α (dati non mostrati).

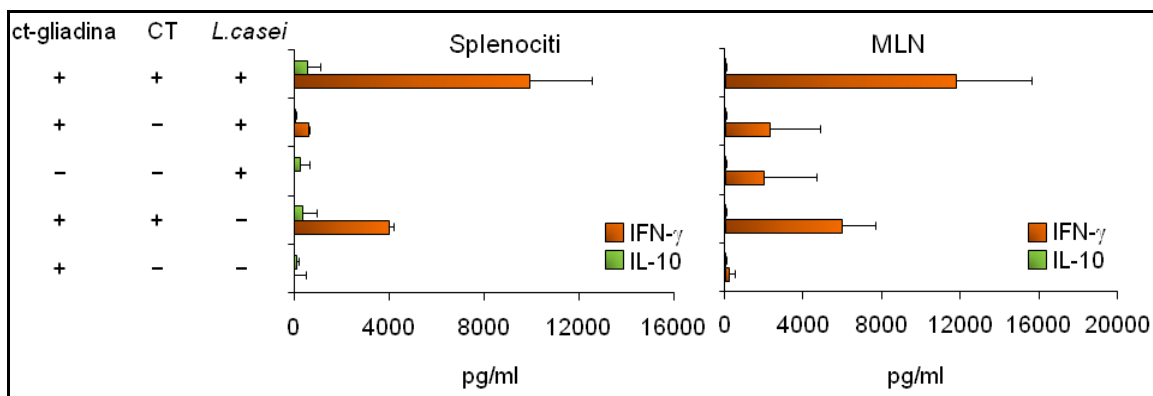


Figura 2: Effetto in vitro di *Lactobacillus casei* sulla espressione del profilo citochinico di splenociti e linfonodi mesenterici.

I valori per ciascuna citochina sono espressi in pg/ml. La barra dell'errore rappresenta la media \pm la deviazione standard di sei animali ed è rappresentativa di tre esperimenti differenti.

*: differenza statistica con il controllo negativo (solo ct-gliadina);

#: differenza statistica rispetto agli animali immunizzati ct-gliadina + CT)

Nel corso della sperimentazione abbiamo anche valutato l'aspetto morfologico dell'architettura del piccolo intestino. I dati riportati nella tabella 1 indicano che la gliadina non è in grado di provocare una significativa riduzione dei villi intestinali, né un aumento della profondità delle cripte di Lieberkun; inoltre non è stato riscontrato un incremento nel numero dei linfociti intraepiteliali (IELs), né quando l'antigene è somministrato da solo, né quando alla somministrazione si aggiunge l'adiuvante mucosale.

Tabella 1: Valutazione morfometrica del piccolo intestino di topi transgenici DQ8 in seguito alla immunizzazione mucosale e alla co-somministrazione di *L.casei*.

| TRATTAMENTO | ALTEZZA VILLI (μm) | PROFONDITA' CRIPTE (μm) | NUMERO LINFOCITI INTRAPITELIALI (CD3+/mm) |
|--|--------------------|-------------------------|---|
| Nessuno | 690 ± 34 | 110 ± 7 | 9 ± 1 |
| CT + ct-gliadina | 690 ± 66 | 107 ± 9 | 10 ± 2 |
| CT + ct-gliadina + <i>L.casei</i> | 703 ± 24 | 101 ± 7 | 9 ± 2 |

Note sperimentali:

Trattamento: i frammenti di intestino tenue sono stati prelevati da topi transgenici DQ8 immunizzati con ct-gliadina e CT e cosomministrati con *L.casei* (1×10^{10} /dose, quattro dosi per settimana).

I valori dell'altezza dei villi e della profondità delle cripte indicano le misurazioni ± la deviazione standard calcolata per 15 misurazioni per ciascun esperimento.

La densità dei linfociti intraepiteliali che esprime il numero di CD3+ è stata determinata contando il numero di cellule positive per millimetro di epitelio (valore ± la deviazione standard).

La co-somministrazione di *Lactobacillus casei* esacerba la risposta immune intestinale gliadina-specifica

Abbiamo valutato se le note proprietà immunostimolanti di *Lactobacillus casei* [Kajikawa A, 2007; Perdigon G, 1988] avessero un effetto nei topi sensibilizzati, al fine di verificare se l'amplificazione della risposta gliadina-specifica fosse in grado di causare un danno mucosale. A questo scopo abbiamo modificato il protocollo sperimentale aggiungendo all'immunizzazione mucosale la somministrazione contemporanea di dosi giornaliere di *L.casei* per quattro giorni a settimana, per tre settimane (come riportato nei metodi).

Dalle analisi *in vitro* è risultato un aumento della proliferazione cellulare e dei livelli di INF- γ in risposta alla gliadina sia nelle cellule spleniche che nei linfonodi mesenterici in seguito al trattamento con il probiotico (fig.1 e 2). Inoltre l'analisi delle citochine ha indicato che il fenotipo della risposta immune rimaneva immutato.

Abbiamo quindi valutato se la risposta mediata da *L.casei* fosse associata ad una preferenziale attivazione di una sottopopolazione di cellule T e quindi abbiamo isolate le cellule CD4+ e CD8+ mediante tecniche immunomagnetiche effettuato poi l'analisi della proliferazione cellulare in presenza di gliadina.

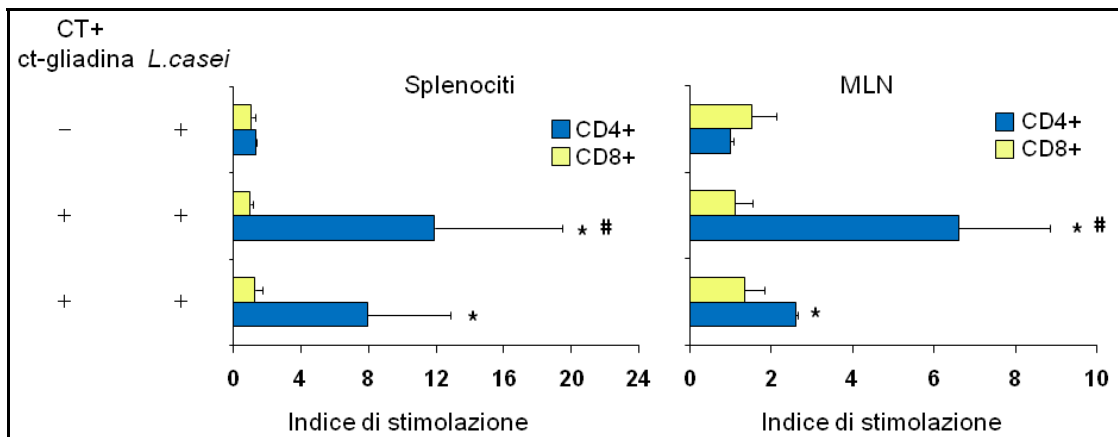


Fig 3: caratterizzazione della risposta indotta dalla co-somministrazione di *L.casei*: proliferazione delle cellule CD4 e CD8 derivate dagli splenociti e dai linfonodi mesenterici.

Le cellule CD4 e CD8 sono state isolate dagli splenociti e dai linfonodi mesenterici mediante tecniche immunomagnetiche e incubate con ct-gliadina e APC.

La barra rappresenta la risposta proliferativa, espressa come indice di stimolazione, considerando il valore \pm la deviazione standard di colture in triplicato e sono rappresentativi di tre esperimenti distinti.

*: differenza statistica rispetto al controllo negativo (solo *L.casei*)

#: differenza statistica rispetto agli animali immunizzati (ct-gliadina + CT).

Il risultato illustrato in fig.3 mostra che somministrazione contemporanea di gliadina e tossina colerica, nonchè l'esacerbazione della risposta dovuta all'aggiunta della co-somministrazione di *L.casei* induce una risposta immune mediata essenzialmente dalle cellule T CD4+. Questo dato è stato ulteriormente confermato dall'analisi delle citochine (dati non mostrati)

Valutazioni sul piccolo intestino in seguito alla somministrazione di *L.casei*.

Abbiamo anche analizzato il piccolo intestino per valutare l'effetto della co-somministrazione del probiotico sull'espressione delle citochine e sull'architettura mucosale. L'analisi del profilo delle citochine espresse a livello intestinale è stata effettuata utilizzando una Real Time PCR multiplex valutando i livelli dei trascritti di IFN- γ , IL-4 e IL-10.

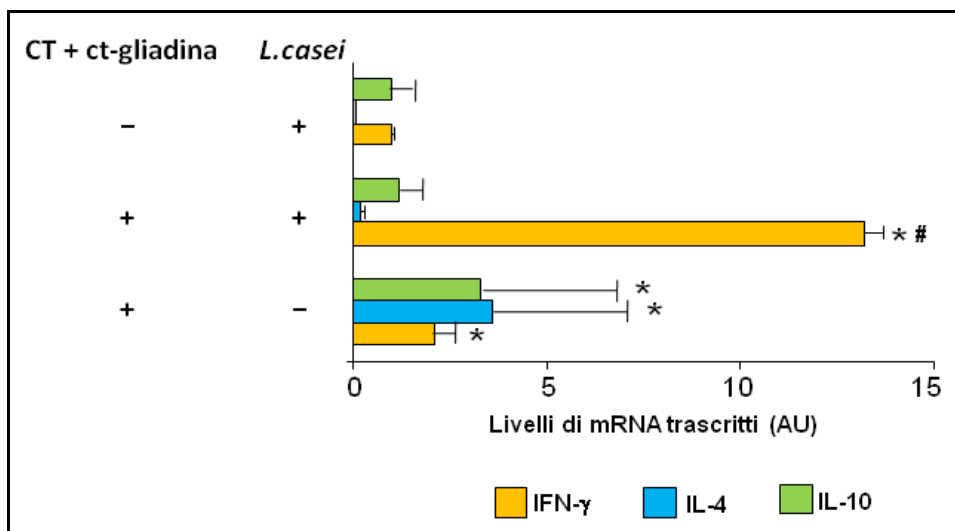


Figura 4: Analisi mediante Real Time PCR delle citochine prodotte nel piccolo intestino in seguito alla somministrazione di *L.casei*. I livelli dei trascritti sono espressi in unità arbitrarie (AU), dopo normalizzazione con il trascritto genico costitutivo L-32. 1 AU corrisponde ai livelli relativi dei trascritti per le citochine nei topi controllo (non trattati).

*: differenza statistica rispetto al controllo negativo (solo *L.casei*);

#: differenza statistica rispetto agli animali immunizzati (gliadina + CT);

Come indicato in fig.4, la somministrazione di *L. casei* da solo induce bassi livelli di IFN- γ e IL-10, e non valutabili livelli di IL-4; dati simili sono stati ottenuti anche in animali controllo (dati non mostrati). L'immunizzazione mucosale, invece, induce un aumento di tutti i trascritti esaminati e la co-somministrazione di *L.casei* provoca un ulteriore aumento dei livelli di IFN- γ , e una diminuzione dei livelli di IL-4 e IL-10.

Dal punto di vista dell'architettura mucosale, i dati in tab.2 evidenziano che nella morfologia della mucosa del piccolo intestino non c'è nessun significativo cambiamento associato con la condizione pro-infiammatoria scaturita dalla co-somministrazione di *L.casei*; dati questi confermati anche dalla mancanza di una perdita di peso nei gruppi analizzati (dati non mostrati).

Effetti dell'inibizione delle ciclo ossigenasi in topi DQ8

Al fine di sviluppare una specifica enteropatia nel nostro modello animale abbiamo investigato la possibilità di bloccare le ciclo-ossigenasi (COXs) intestinali, enzimi coinvolti nella sintesi delle prostaglandine a partire dall'acido arachidonico, utilizzando l'indometacina, un farmaco anti infiammatorio non steroideo [Newberry RD, 1999]. Questo farmaco è stato utilizzato a concentrazioni non enteropatiche secondo quanto riferito da Hashimoto et al. [Hashimoto K, 2005] nonché dopo un'accurata determinazione dell'ottimale tempistica messa a punto con una serie di esperimenti preliminari. Pertanto il nostro protocollo sperimentale di immunizzazione mucosale con ct-gliadina insieme con la tossina colerica e la co-somministrazione di *L.casei*, si è arricchito dell'ulteriore trattamento con indometacina per 13 giorni, come descritto nella sezione dei materiali e metodi.

Dall'inizio del trattamento con indometacina, tutti gli animali sono stati giornalmente pesati. Come atteso l'indometacina da sola inibisce la sintesi della prostaglandina E₂ (dati non mostrati), ma non induce una lesione nel piccolo intestino: infatti come si può notare dalla figura 5 la riduzione dei villi intestinali si riscontra nel gruppo sperimentale che è stato sensibilizzato con la ct-gliadina e l'adiuvante mucosale, insieme con la somministrazione di *L.casei* e di indometacina (fig.5 B), rispetto al

gruppo di animali non trattati (fig 5 A) o agli animali trattati con la sola indometacina (fig 5 D) o agli animali immunizzati e trattati con *L.casei* (fig 5 C).

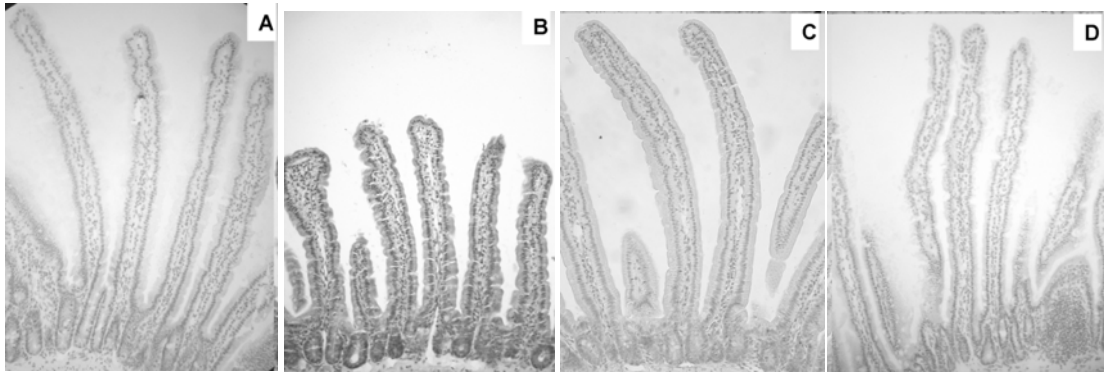


Fig 5: Effetto della somministrazione dell'indometacina sul piccolo intestino. A: non trattati; B: immunizzazione + *L.casei* + indometacina; C: immunizzazione + *L.casei*; D: solo indometacina.

Va evidenziato, dunque, che l'indometacina causa una riduzione dell'altezza dei villi negli animali immunizzati (fig.5 B), anche se questo fenomeno non è associato con la perdita di peso (figura 6), mentre una significativa diminuzione di peso dal giorno 10 è evidente negli animali non trattati con *L.casei*.

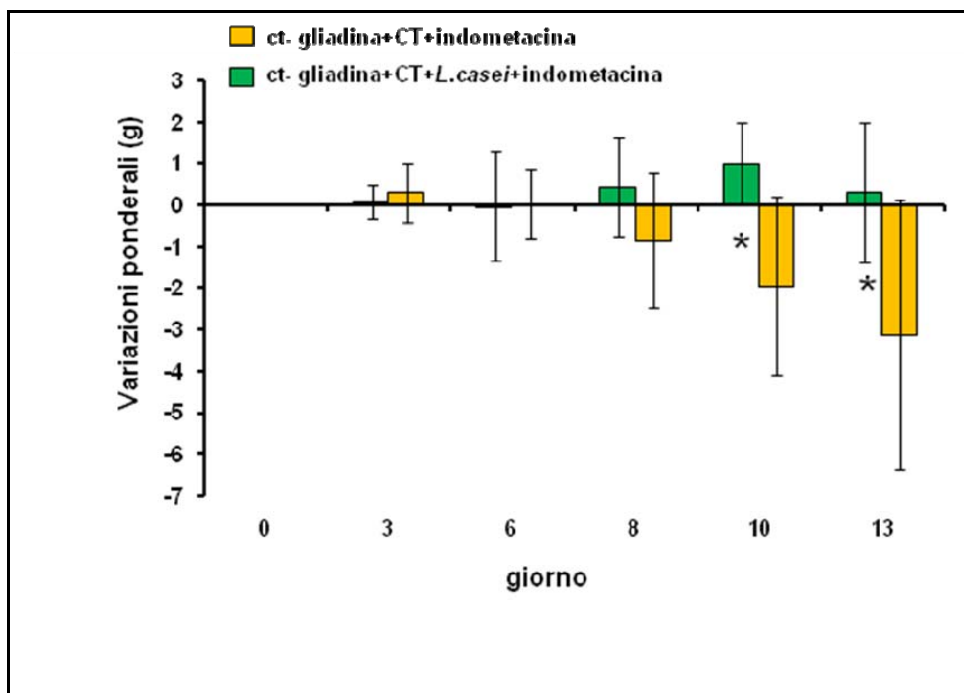


Figura 6: Variazioni ponderali a seguito della somministrazione di indometacina.

*: differenza statistica rispetto alla trattamento ct-gliadina+CT + indometacina.

Valutazione dell'effetto di *L.casei* insieme con la somministrazione di indometacina in topi transgenici DQ-8 sensibilizzati con la gliadina

La valutazione della lesione intestinale indotta dal trattamento descritto è stata effettuata conducendo una analisi morfometrica sui vari gruppi sperimentali. Come si può notare nella figura 7 gli animali immunizzati, in seguito al trattamento con indometacina manifestano una diminuzione dell'altezza dei villi (figura 7 A), mentre la profondità delle cripte e il numero di linfociti intraepiteliali (IELs) rimane invariato (figura 7 B e C).

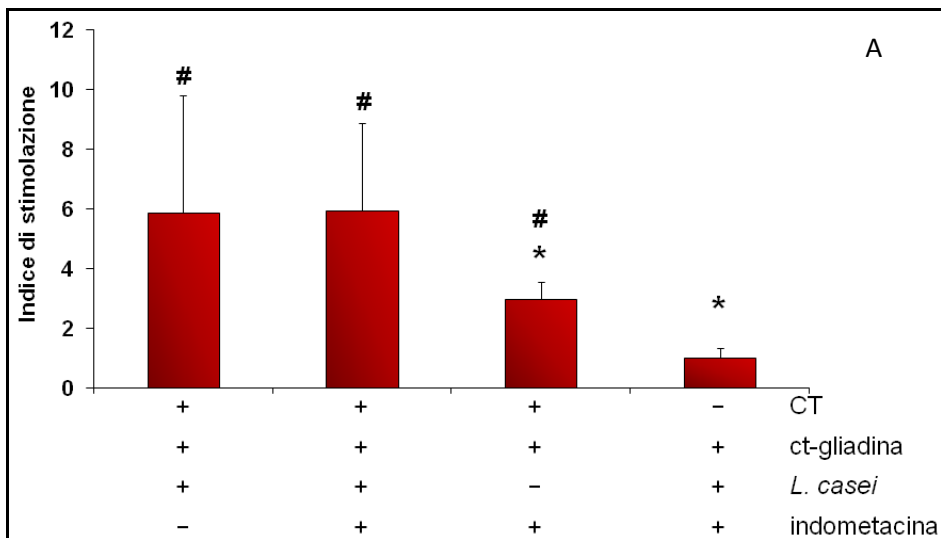


Figura 7: Analisi della mucosa intestinale.

A: valutazione dell'altezza dei villi intestinali.

*: differenza statistica rispetto al gruppo trattato con ct-gliadina + *L.casei* + indometacina

#: differenza statistica rispetto al gruppo trattato con ct-gliadina + *L.casei* + CT

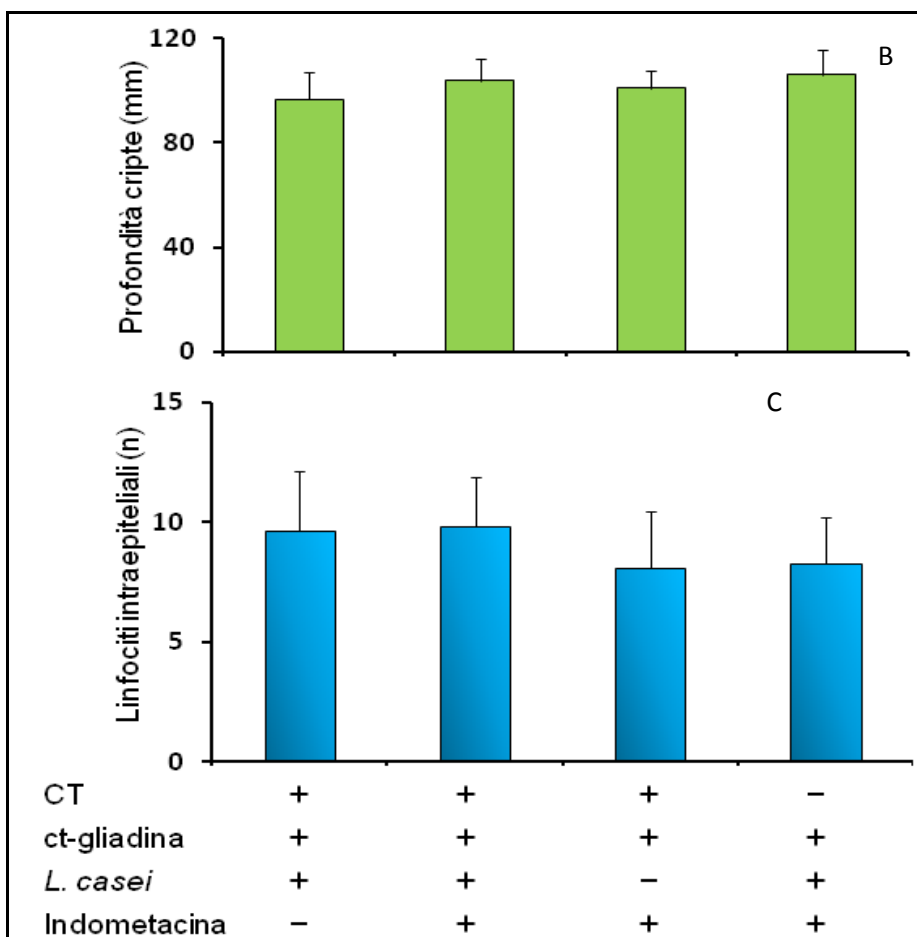


Figura 7: Analisi della mucosa intestinale.

B: numero di linfociti intraepiteliali;

C: misurazione profondità cripte (in μm).

Queste analisi, effettuate sulla popolazione linfocitaria CD4+ derivata dai linfonodi mesenterici, indicano che l'effetto dell'indometacina non è correlato con l'aumento della risposta immune specifica per la gliadina. Tuttavia gli animali che non sono stati trattati con *L.casei* hanno mostrato una ridotta proliferazione cellulare, confermando quanto già ottenuto; Inoltre il grado di riduzione dei villi è simile nei gruppi sperimentali che hanno subito l'immunizzazione (ct-gliadina e tossina colerica) e il trattamento con l'indometacina, indipendentemente dalla presenza del probiotico; questi dati suggeriscono che, in questo modello sperimentale, il danno mucosale non è mediato dalla esacerbazione della risposta immune cellulo-mediata specifica per la gliadina.

Effetto della somministrazione di indometacina in topi transgenici DQ8 sensibilizzati con gliadina.

Dal momento che la presenza di *L.casei*, pur esacerbando la risposta immune, non induce danno mucosale, abbiamo esaminato più in dettaglio il reale contributo dei singoli componenti del nostro trattamento, escludendo, in questa fase, il probiotico (figura 8).

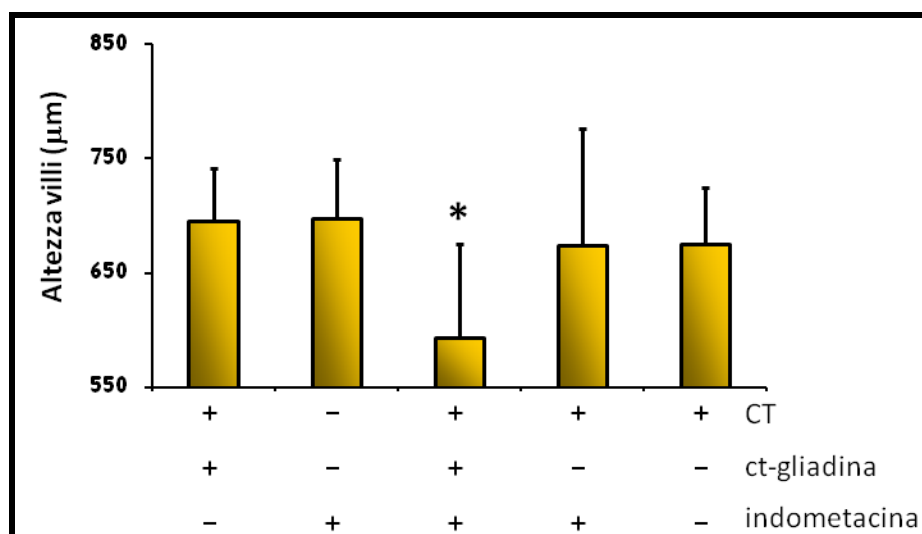


Figura 8: Contributo dei singoli componenti del trattamento sperimentale nell'induzione del danno mucosale.

Come mostrato nella figura 8, soltanto gli animali che hanno ricevuto la ct-gliadina con l'indometacina e la tossina colerica mostrano un significativo abbattimento dei villi intestinali; in particolare la risposta immune intestinale alla gliadina è cruciale per l'innesco della lesione: infatti la somministrazione della sola tossina colerica, le cui proprietà immunogeniche sono ben note, seguita dal trattamento con indometacina, non è in grado di indurre alcun danno (fig.8).

Inoltre la gliadina, così come la CT non riesce a indurre un aggiuntivo decremento ponderale nei topi trattati con indometacina, suggerendo che questo parametro è legato alla somministrazione di indometacina (figura 9).

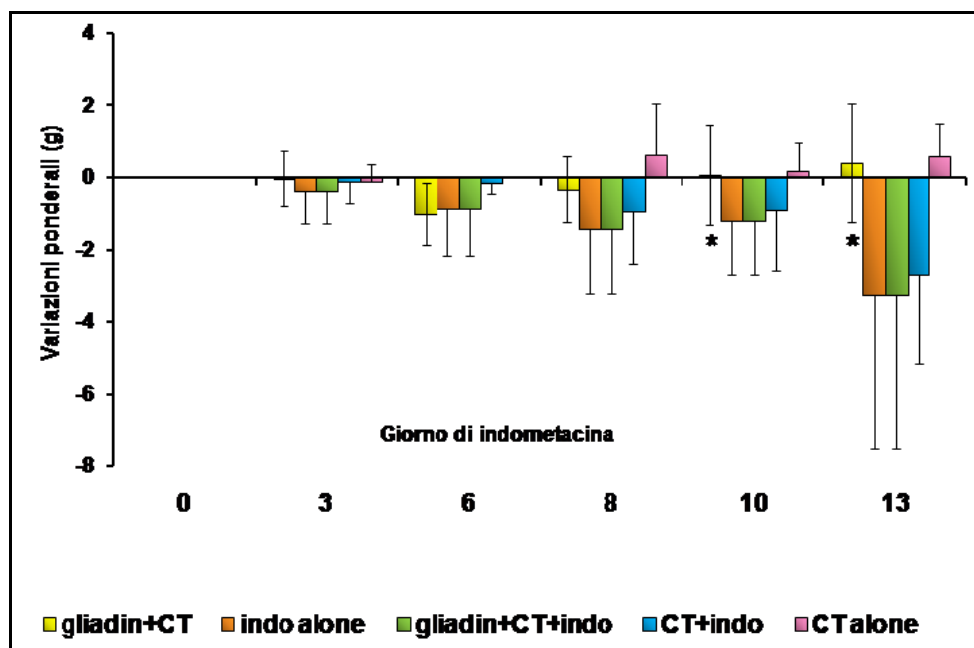


Figura 9: variazioni ponderali a seguito del trattamento con indometacina. Ciascun gruppo sperimentale era costituito da 20 animali;
*: differenza statistica rispetto al trattamento con solo indometacina

Per caratterizzare meglio l'effetto dell'indometacina a livello sistemico, i sieri raccolti da ciascun gruppo sperimentale sono stati raggruppati e analizzati mediante SDS-PAGE per valutare le differenze nel profilo delle proteine (figura 10)

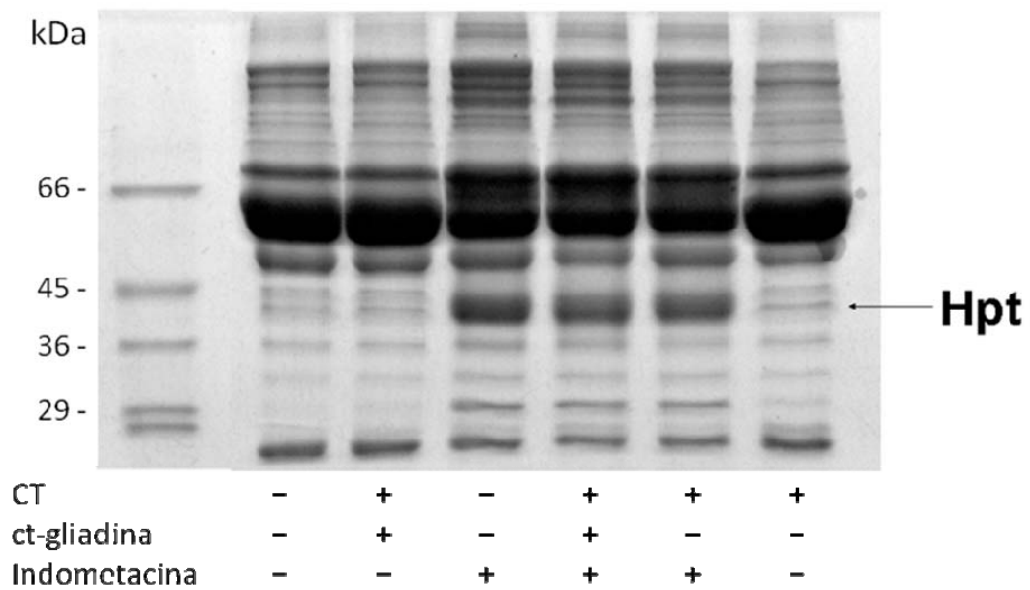


Figura 10: Profilo proteico di sieri, analizzati per SDS-PAGE e colorati con blu di comassie.

Dai dati ottenuti non si evincono differenze qualitative, ma una banda da 42 kDa mostra notevoli cambiamenti di intensità di colore (fig.10). In particolare questa banda proteica è notevolmente più intensa nei sieri degli animali trattati con indometacina, ma non si evidenziano ulteriori incrementi nei sieri degli animali immunizzati con gliadina. L'apparente peso molecolare di questa proteina combacia con l'aptoglobina, una ben nota proteina di fase acuta, la cui concentrazione, secondo quanto riportato, aumenta in risposta alle infezioni, infiammazione o danno tissutale [Shapiro SZ, 1992].

Meccanismi immuni coinvolti nel danno mucosale

Abbiamo ulteriormente analizzato i meccanismi immuni cellulo-mediati coinvolti nella lesione mucosale, tramite tecniche immunoistochimiche di frammenti di piccolo intestino prelevati dagli animali trattati secondo il protocollo sperimentale.

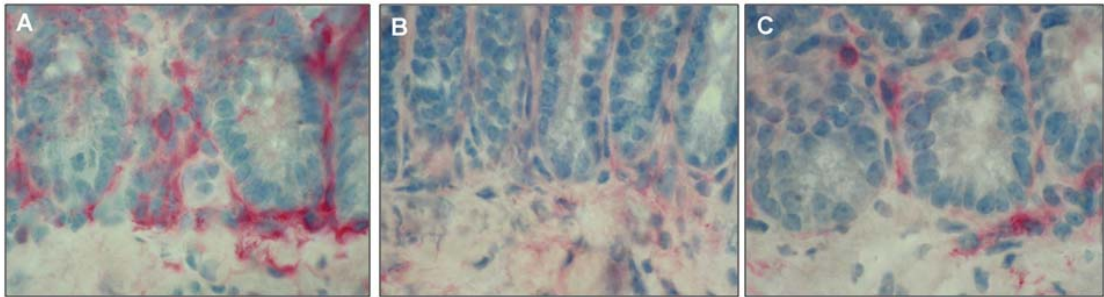


Figura 11: meccanismi immuni coinvolti nella lesione intestinale. Immunoistochimica della mucosa intestinale che modtra un aumento delle cellule CD25+ (indicate dal contorno rosso) nella lamina propria degli animali immunizzati e poi trattati con indometacina (A), rispetto agli animali solo immunizzati (B) o trattati solo con indometacina (C). Magnificazione 100X.

La figura 11 (comparando il gruppo A con B e C), evidenzia che la lesione della mucosa è associata con un aumento di cellule CD25+ nella lamina propria (LP). La fig.12 illustra quanto evidenziato con la microscopia confocale: sia le cellule T (fig.12 A) che le cellule dendritiche/macrofagi (fig.12 B) sono attivate.

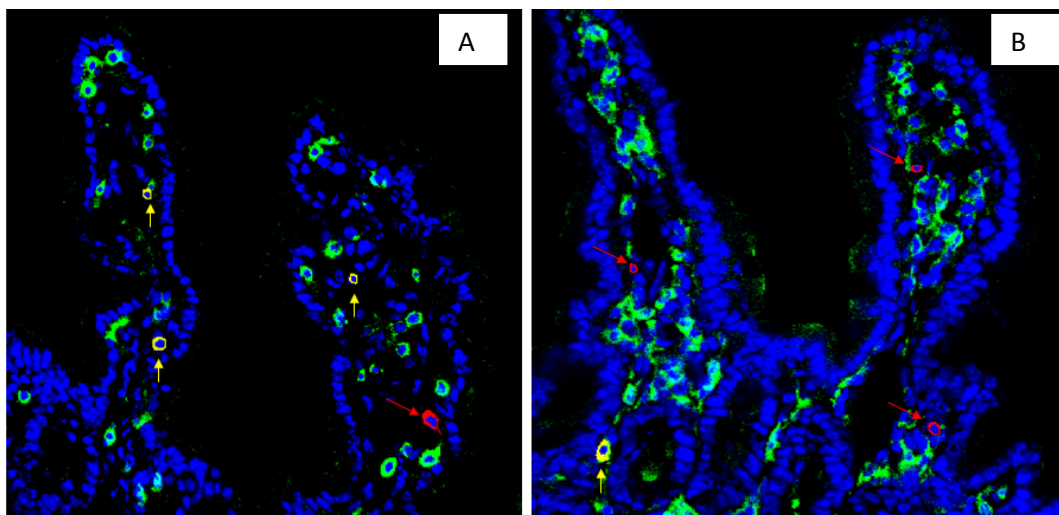


Figura 12: Analisi della mucosa intestinale al microscopio confocale.

A: attivazione delle cellule T della lamina propria; verde: CD3+; rosso: CD25+; giallo: F480+ CD25+

B: attivazione delle cellule dendritiche/macrofagi nella lamina propria; verde: F480+; rosso: CD25+; giallo: F480+ CD25+

Magnificazione 40X.

Inoltre tramite la tecnica TUNEL abbiamo dimostrato che il numero di cellule apoptotiche nella LP degli animali trattati era più alto che negli animali controllo (cioè trattati solo con indometacina) (fig 13).

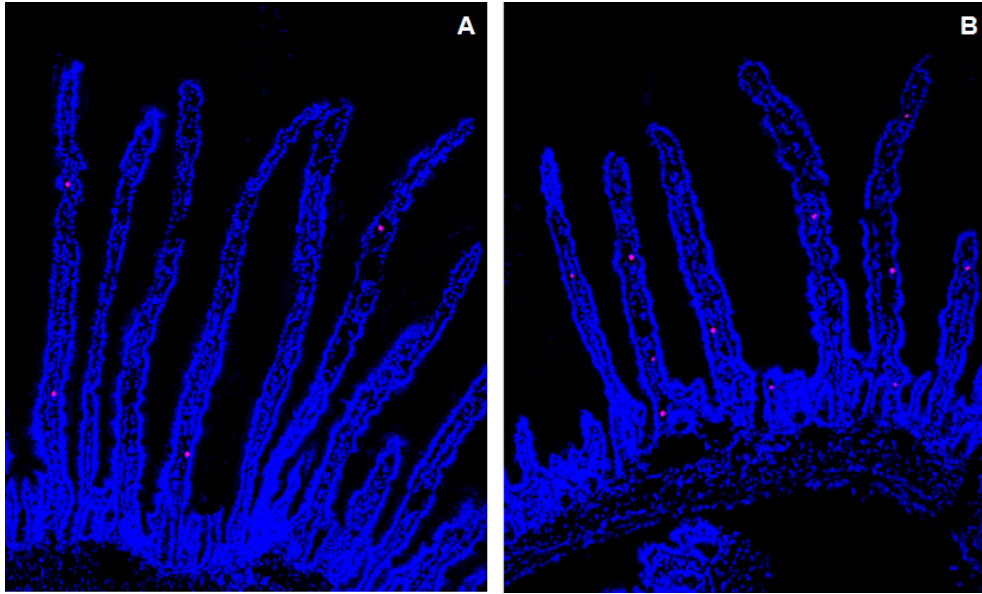


Figura 13: Meccanismi immuni coinvolti nella lesione immunitaria. Valutazione delle cellule apoptotiche (indicate in rosa) mediante microscopia confocale. A: animali trattati solo con indometacina. B: animali trattati con indometacina + tossina colerica + ct-gliadina. Magnificazione 20X. La valutazione statistica dei dati indica che l'aumento è correlato con la presenza della gliadina insieme con la tossina colerica è illustrata nella figura 14.

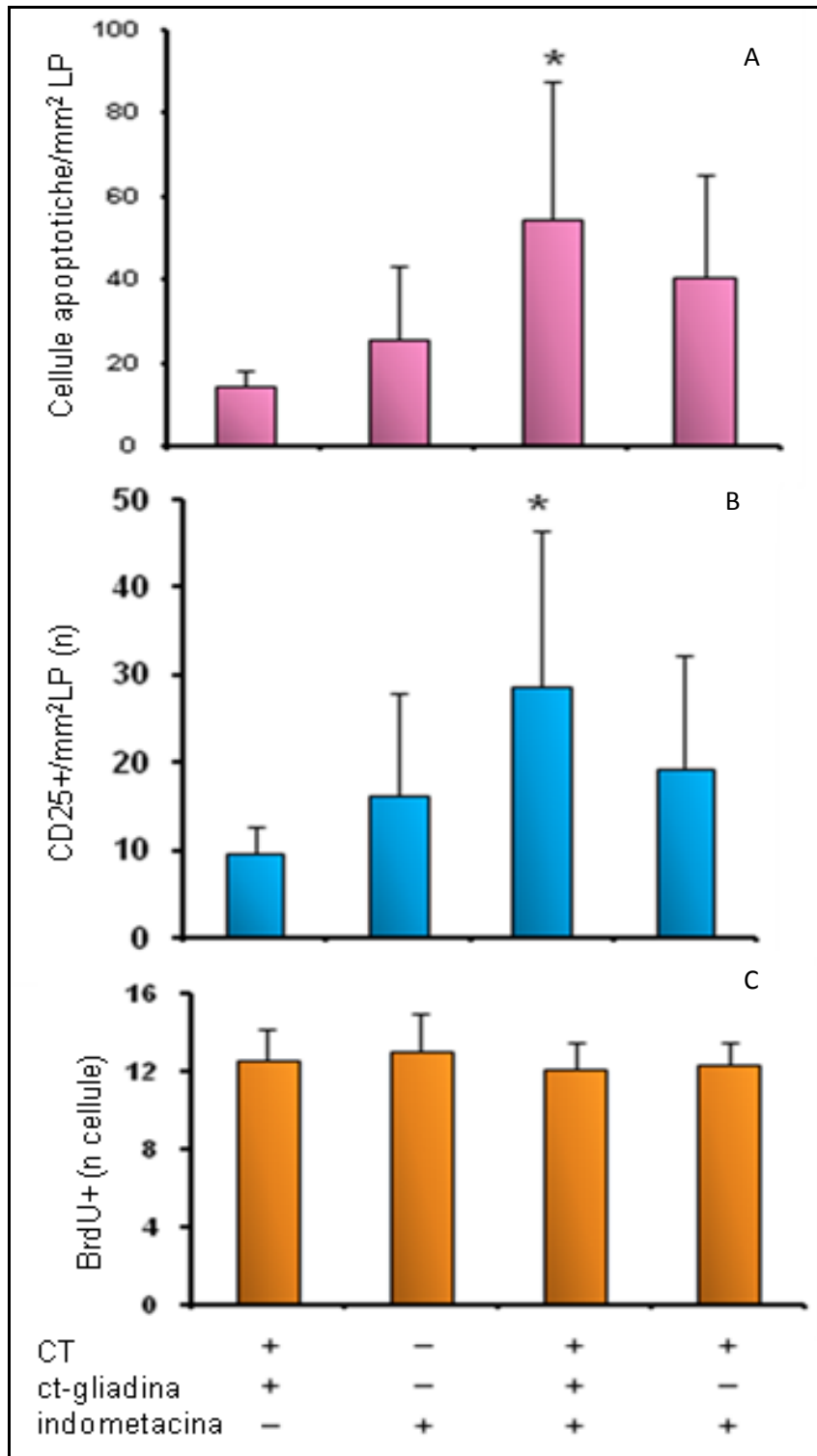


Figura 14: Meccanismi immuni coinvolti nella lesione immunitaria. Valutazione statistiche nella lamina propria. A: numero di cellule apoptotiche; B: numero cellule CD25+; C: numero cellule BrU+ I valori sono indicativi di tre esperimenti indipendenti.

*: differenza statistica rispetto a tutti gli altri gruppi.

Come mostra la figura 14 negli enterociti presenti sui villi non si riscontra apoptosi e non c'è nessun aumento nella velocità proliferativa delle cellule epiteliali delle cripte, come indica l'analisi dalla cattura della bromo-deossi-uridina (BrdU). Questi risultati sono in linea con la mancanza dell'iperplasia delle cripte.

A partire dai linfonodi mesenterici abbiamo isolato i linfociti, che sono stati analizzati in vitro per determinare il profilo delle citochine intestinali (figura 15).

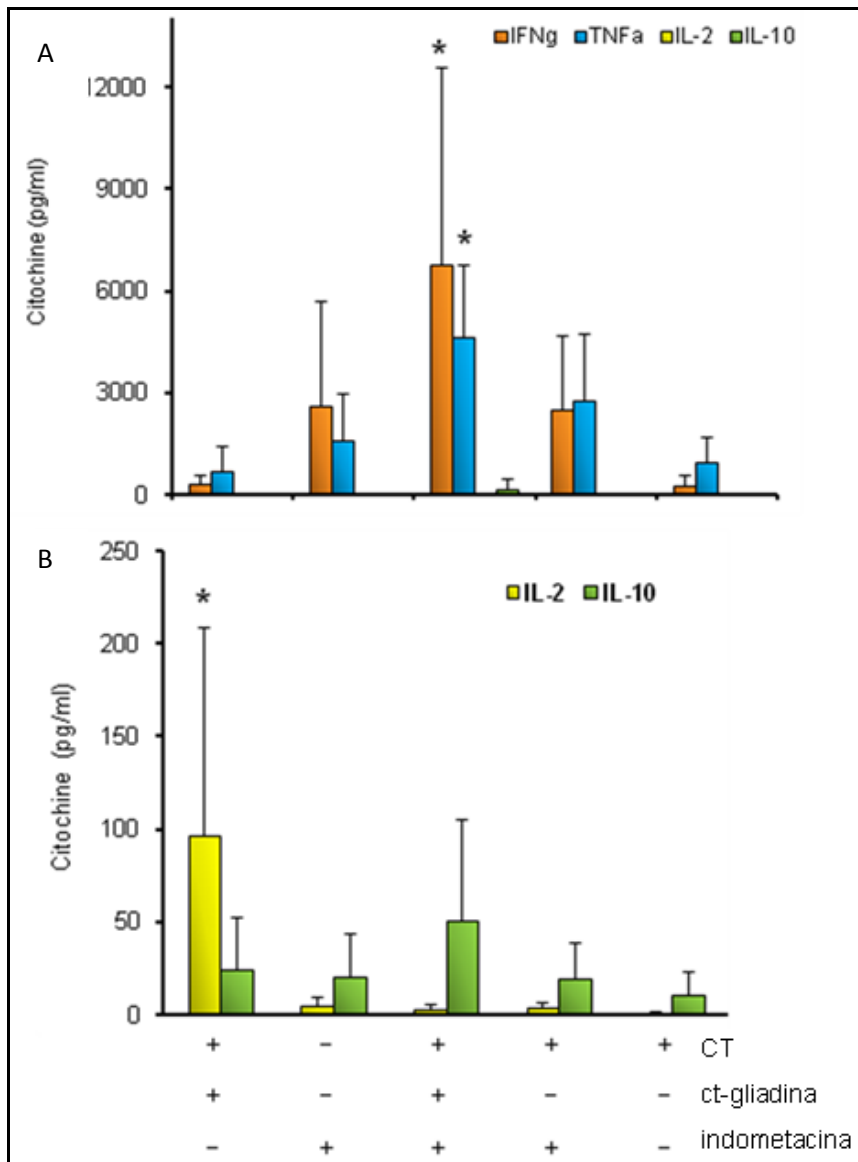


Figura 15: Analisi della produzione di citochine a seguito della somministrazione di indometacina. Ciascun gruppo sperimentale è costituito da 20 animali. A: profilo citochinico nei linfonodi mesenterici degli animali trattati; B: livelli di IL-2 e IL-10 nei linfonodi mesenterici degli animali trattati.

*: differenza statistica rispetto alla somministrazione di sola indometacina.

I risultati ottenuti indicano negli animali immunizzati e trattati con indometacina si verifica una maggiore produzione di IFN- γ e TNF- α , ma i livelli di IL-2 e IL-10 sono molto bassi (Figura 15 A). La massiva produzione di queste citochine pro infiammatorie ha impedito la valutazione della loro espressione specifica per l'antigene (dati non mostrati). Al contrario è apparso evidente che l'espressione gliadina-specifica dell'IL-2 è soppressa negli animali trattati con indometacina, mentre i bassissimi livelli di IL-10 prodotta dalle cellule stimulate appare simile nei vari gruppi (fig.15 B). Inoltre IL-4 non è stata valutabile sia nelle cellule stimulate che non stimulate di tutti i gruppi sperimentali (dati non mostrati).

Meccanismi biochimici associati con l'inizio della lesione intestinale

Per analizzare a fondo i meccanismi che si verificano in seguito ad uno sbilanciamento dell'immunità mucosale e che sono alla base del danno mucosale stesso, abbiamo utilizzato la real time PCR per valutare l'espressione differenziale di alcuni geni; i geni presi in esame sono stati 84, tutti correlati con la matrice extracellulare e le molecole di adesione. La procedura utilizzata prevedeva l'amplificazione dei segnali dei trascritti di interesse nel gruppo di animali immunizzati (CT+ct-gliadina+indometacina) e la successiva normalizzazione ai valori del gruppo controllo (solo indometacina). Questi trascritti sono stati calcolati in base al cambiamento nell'espressione genica. Inoltre sono stati anche valutati i livelli di espressione genica degli animali immunizzati che non hanno subito il trattamento con indometacina, per avere la completa comparazione dei campioni. Dai risultati ottenuti abbiamo riscontrato che nei gruppi esaminati quasi la metà dei geni analizzati viene modulata e anche la maggior parte di essi solo in maniera marginale (dati non mostrati). La tabella 2 riporta la lista dei geni che mostrano una stimolazione o un silenziamento dei trascritti degli mRNA.

| Gene | Descrizione del gene | n.accesso Gene Bank | CT+ct-gliadina + indo vs. solo indo rapporto incrementale (valore \pm DS) | CT+ct-gliadina vs. solo indo rapporto incrementale (valore \pm DS) | t-test (P) |
|--|--|---------------------------|---|--|------------|
| Proteine della matrice extracellulare | | | | | |
| Adamts2 | Disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2 | NM_175643 | 4.16 \pm 2.18 | 1.06 \pm 0.15 | 0.04 |
| Lama1 | Laminina alfa-1 | NM_008480 | 0.17 \pm 0.07 | 0.16 \pm 0.02 | 0.36 |
| Lamb3 | Laminina, beta 3 | NM_008484 | 4.8 \pm 1.17 | 1.33 \pm 0.57 | 0.03 |
| Mmp7 | Metalloproteinasi di matrice 7 | NM_010810 | 3.8 \pm 1.36 | 0.95 \pm 0.01 | 0.03 |
| Mmp8 | Metalloproteinasi di matrice 8 | NM_008611 | 7.23 \pm 2.76 | 0.04 \pm 0.008 | 0.03 |
| Mmp13 | Metalloproteinasi di matrice 13 | NM_008607 | 0.3 \pm 0.11 | 0.73 \pm 0.14 | 0.04 |

| | | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------|------------|------|
| Spp1 | Fosfoproteina secreta 1 | NM_009263 | 8.6 ± 9.25 | 0.72± 0.07 | 0.14 |
| Thbs1 | Trombospondina 1 | NM_011580 | 3.02 ± 1.17 | 3.78± 2.83 | 0.39 |
| Molecole di adesione cellulare | | | | | |
| Sel1 | Selectina dei linfociti | NM_011346 | 0.26± 0.13 | 1.43± 0.61 | 0.11 |
| Thbs2 | Trombospondina 2 | NM_011581 | 13.76± 17.8 | 1.66± 0.4 | 0.17 |

Tabella 2: Elenco dei geni i cui aumenta (>3) o diminuisce (<0,3) l'espressione dei trascritti

Come si può notare dalla tabella, la trascrizione di quattro geni aumenta in maniera significativa (>3) nel gruppo degli animali trattati quando comparati con gli animali immunizzati, ma non sottoposti al trattamento con indometacina. Le proteine codificate da questi geni appartengono alla famiglia delle proteine della matrice extracellulare (ECM) e includono Adamts2, Lamb3, Mmp7 e Mmp8. Questi prodotti comprendono una varietà di classificazioni incluso i costituenti della membrana basale (Lamb3) e le proteinasi ECM (Adamts2, Mmp7 e Mmp8). L'aumentata espressione di Spp1 e Thbs2 è stata anche trovata in alcuni topi trattati ma non in altri, mentre è stata rilevata un significativo aumento di Thbs1, anche negli animali sensibilizzati che non avevano ricevuto l'indometacina. Inoltre due geni ECM (Lama1 e Mmp13) e una molecola trans membrana (Sell) non sono stimulate nei topi trattati (<0.3). Tuttavia solo l'espressione di Mmp13 presenta differenze statistiche tra gli animali immunizzati e quelli non trattati.

Abbiamo poi condotto una più approfondita valutazione delle metalloproteasi mediante una zimografia con substrato per analizzare l'attività dell'enzima nel tessuto intestinale. Secondo lo zimogramma in gelatina (figura 16 A), l'indometacina attiva

moderatamente MMP2 (66 kDa) negli animali immunizzati rispetto agli animali di controllo, mentre due bande che migrano approssimativamente a 85 kDa e 72 kDa corrispondono alla forma attiva di MMP9 e a quella latente di MMP2, rispettivamente e risultano aumentate nei topi che hanno ricevuto la sola indometacina.

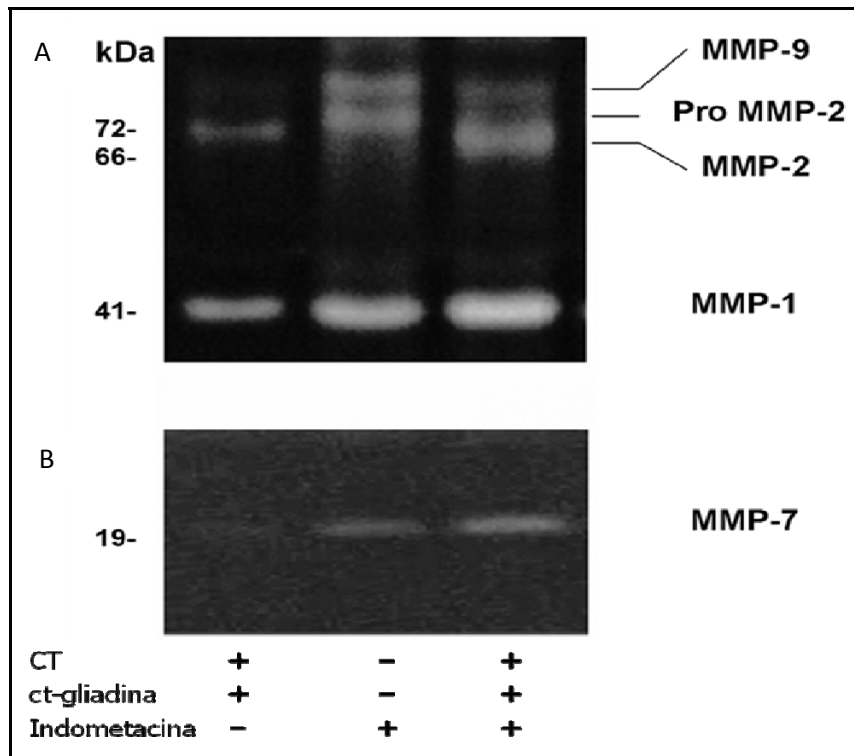


Figura 16: Zimografia delle MMPs. A: zimogramma con gelatina; B: zimogramma con caseina.

Inoltre il trattamento con indometacina aumenta in maniera marcata l'attività di MMP1 (41kDa) negli animali immunizzati. Dai risultati ottenuti con lo zimogramma in caseina, utile per evidenziare MMP8 [Heiligenhaus A, 2005], non è stata osservata alcuna attività nelle MMP in tutti i gruppi esaminati (dati non mostrati), ad eccezione di una aumentata attività di MMP7 negli animali immunizzati e trattati anche con l'indometacina (fig.16 B).

Effetto di alcuni ceppi di *Lactobacillus* e effetto di *Bifidobacterium lactis* sulle cellule dendritiche derivate da midollo osseo di topi transgenici DQ8.

Alla luce di quanto evidenziato con *L.casei*, abbiamo testato altri ceppi batterici e valutato la variazione della risposta immune intestinale. Il protocollo sperimentale seguito è stato lo stesso utilizzato per *L.casei*: alla immunizzazione mucosale è stata aggiunta la contemporanea somministrazione di dosi giornaliere del probiotico in esame. I ceppi utilizzati per la sperimentazione sono stati: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Bifidobacterium lactis*.

Come prima fase abbiamo valutato l'effetto di due differenti dosi di *L.casei* e *L.fermentum* (10^5 and 10^8 CFU/ml) sulla maturazione delle cellule dendritiche derivate da midollo osseo di topi transgenici DQ8. I batteri sono stati aggiunti al decimo giorno della coltura cellulare e sono stati incubati per 48 ore a 37°C con 5% CO₂, prima che le cellule fossero raccolte. Alla fine del tempo di incubazione le cellule sono state colorate con anticorpi specifici e analizzate al FACS per misurare l'espressione del marcatore CD11c, specifico per le cellule dendritiche, e per valutare i livelli delle molecole costimolatorie B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86).

Le valutazioni effettuate su *L.casei* e *L.fermentum* sono illustrate in figura 17, da cui si evince un effetto dose-dipendente sull'aumento dell'espressione di CD86, mentre non è stata riscontrata alcuna variazione per CD11c e CD80 (dati non mostrati).

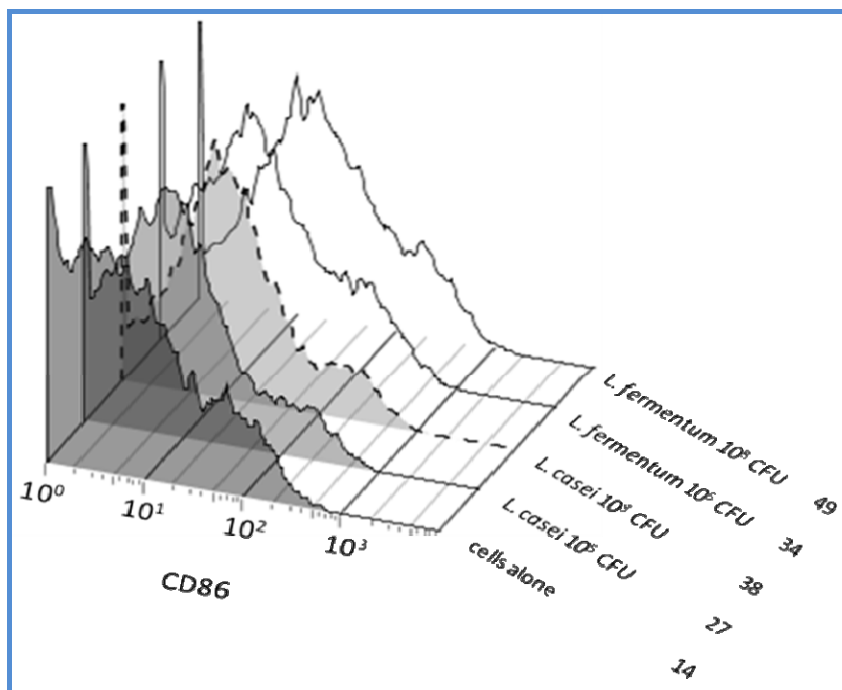


Figura 17: Espressione di CD86 in cellule dendritiche derivate da midollo osseo e incubate in vitro con 10⁵-10⁸ CFU di *L.casei* or *L.fermentum*: aumento dell'espressione CD86 in maniera dose-dipendente. Il numero indica la percentuale di espressione. LPS è stato utilizzato come controllo (non mostrato)

I supernatanti di queste stesse colture sono stati utilizzati per valutare il profilo di alcune citochine mediante test ELISA.

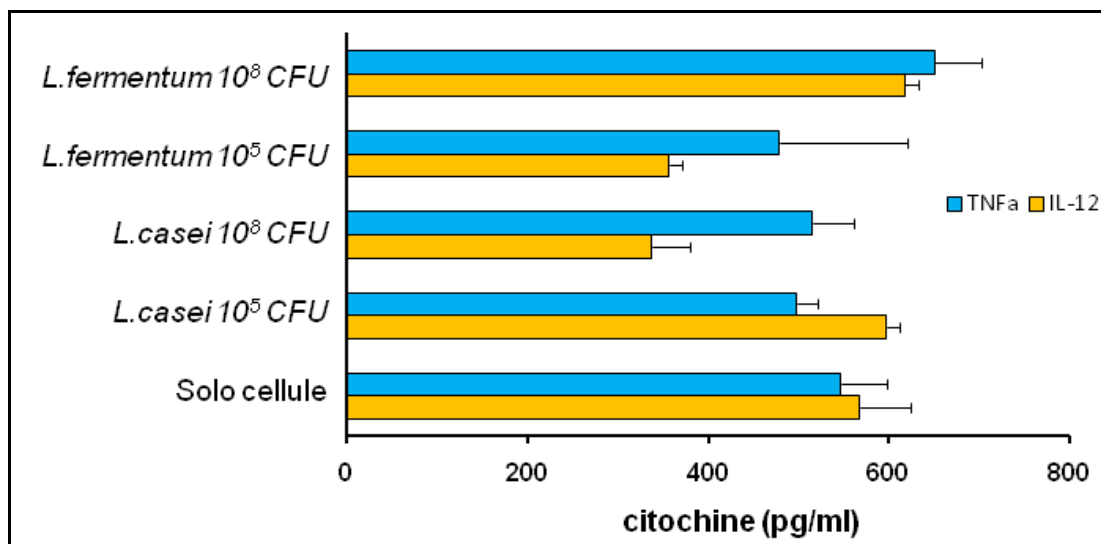


Figura 18: Profilo citochinico delle cellule dendritiche derivate da midollo osseo e incubate in vitro con le diverse concentrazioni di *L.casei* e *L.fermentum* (10⁵ e 10⁸ CFU).

Le nostre analisi condotte su IL-12, TNF- α , IL-4 e IL-10 non hanno evidenziato nessun significativo aumento nella secrezione di IL-12 e TNF- α (figura 18) mentre per IL-10 e IL-4 i valori sono stati non valutabili (dati non mostrati).

Successivamente sulla base di questi risultati abbiamo effettuato ulteriori analisi ampliando il numero di probiotici ed inserendo nella sperimentazione *L.plantarum*, *L.paracasei* e *Bifidobacterium lactis*, utilizzando tutti i ceppi ad una unica concentrazione pari a 10^8 CFU. I risultati sono riportati in figura 19 ed evidenziano la capacità di tutti i ceppi analizzati di stimolare l'espressione di CD86, ma con intensità differente.

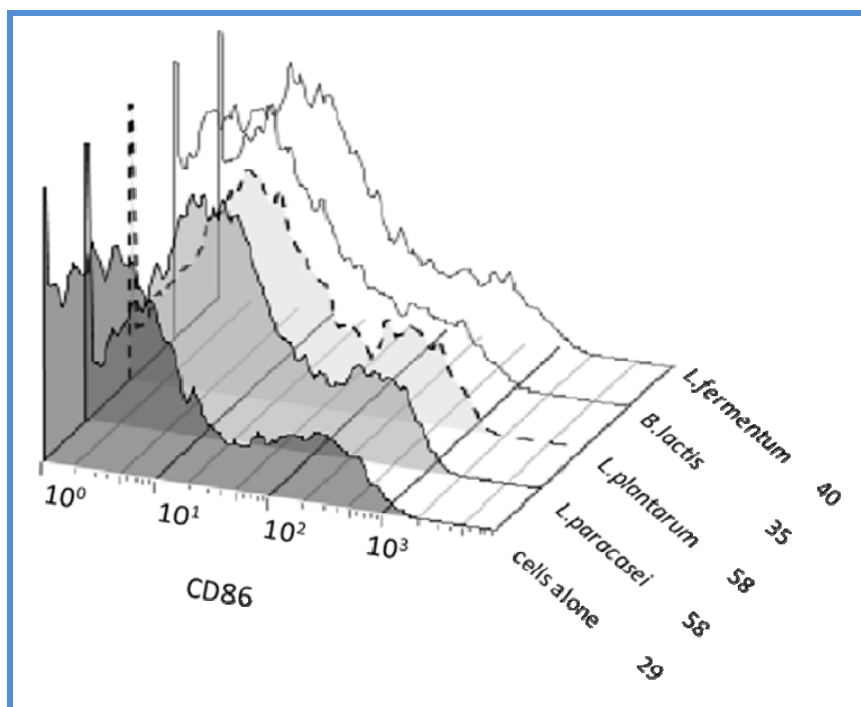


Figura 19: Espressione di CD86 in cellule derivate da midollo osseo e incubate in vitro con differenti ceppi probiotici alla concentrazione 10^8 CFU/punto sperimentale.

L'aumento dell'espressione di CD86 dipende dal ceppo utilizzato; in particolare *L.plantarum* e *L.paracasei* inducono le espressioni più alte. Tuttavia nessuno dei ceppi analizzati ha mostrato capacità modulatoria sull'espressione di CD11c e CD80, come del resto avevamo già riscontrato con *L.casei* e *L.fermentum* (dati non mostrati). Anche in questo caso sono state effettuate valutazioni sul profilo citochinico: nessuno dei

probiotici testati ha mostrato differenze significative rispetto al controllo nella produzione di IL-12, mentre *B.lactis*, *L.plantarum* e *L.paracasei* hanno evidenziato un significativo aumento nella produzione di TNF- α ; in particolare i più alti livelli di TNF- α sono stati ottenuti a seguito dell'incubazione di *L.plantarum* e *L.paracasei* (figura 20)

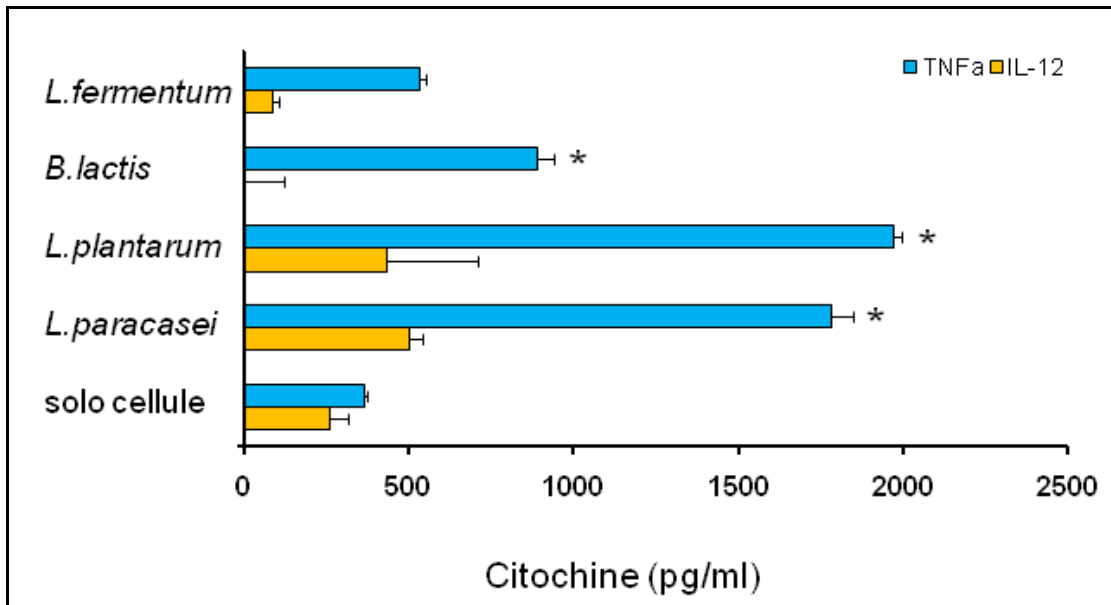


Figura 20: Profilo citochinico in cellule derivate da midollo osseo e incubate con 10^8 CFU di differenti ceppi probiotici.

Analisi della risposta immune intestinale specifica per la gliadina indotta dalla co-somministrazione dei probiotici.

I probiotici sono poi stati testati sul nostro modello murino di enteropatia intestinale al glutine, il topo transgenico DQ8. Il protocollo sperimentale utilizzato è stato lo stesso per *L.casei*: sensibilizzazione intragastrica con un digesto chimotriptico della gliadina insieme con la tossina colerica come adiuvante mucosale e la contemporanea somministrazione del probiotico. Il trattamento induce una risposta immune Th1 nei confronti della gliadina, caratterizzata essenzialmente dalla produzione di IFN- γ . Infatti, come illustrato nella figura 21, viene indotto un aumento nel rilascio di IFN- γ sia nel compartimento sistemico, sia in quello mucosale, e questo aumento risulta significativo a seguito della somministrazione di *L.casei*.

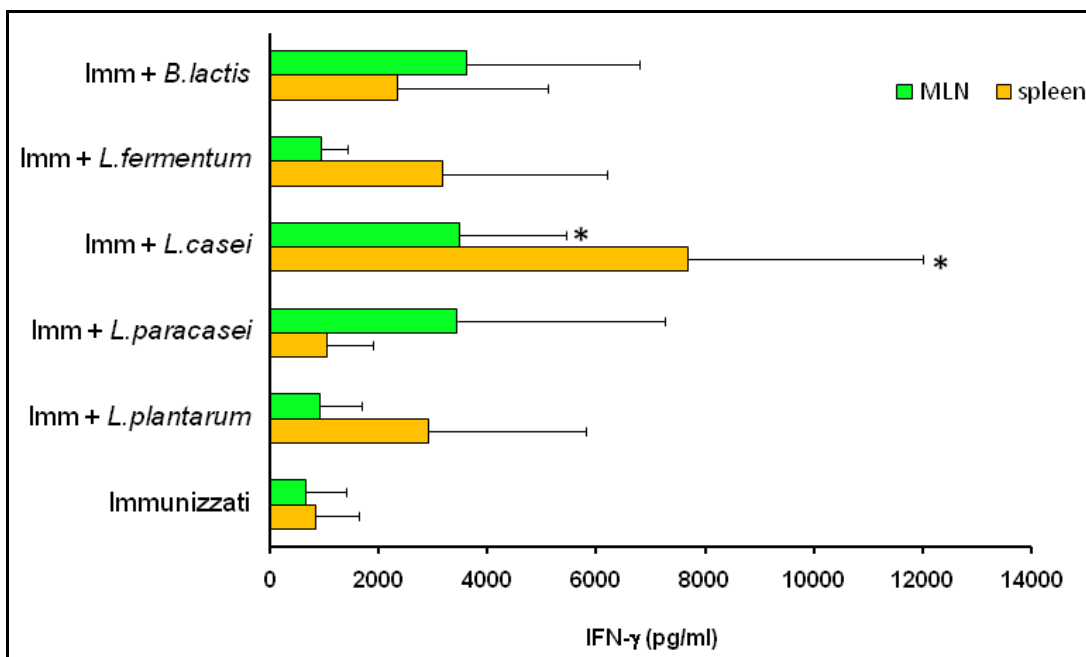


Figura 21: Effetto in vivo della somministrazione dei probiotici sulla risposta immune intestinale alla gliadina. Nessun effetto significativo tranne la conferma di *L. casei*.

Tuttavia *L. casei* non induce sulle altre citochine analizzate lo stesso effetto, anzi i valori di TNF- α non sono stati valutabili (figura 22), così come IL-4 e IL-10 (dati non mostrati).

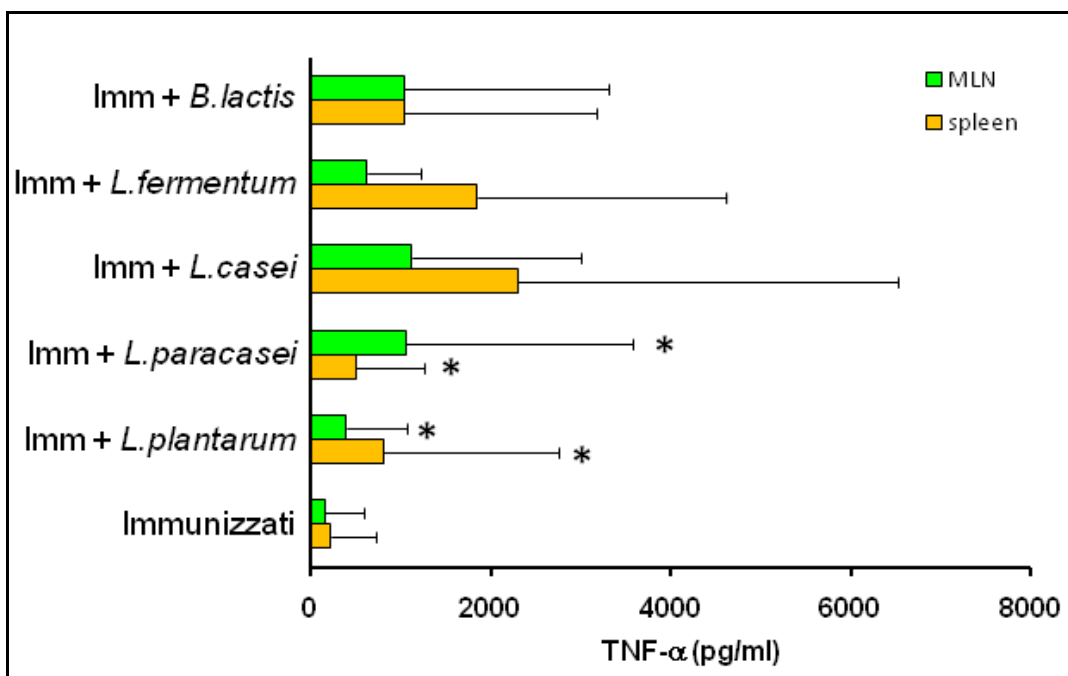


Figura 22: Effetto in vivo della somministrazione dei probiotici sulla risposta immune specifica per la gliadina.

E' stato invece registrato un effetto statisticamente significativo per TNF-a dopo il trattamento con *L.paracasei* e *L.plantarum*, sia nel compartimento sistemico sia in quello mucosale (figura 22).

Sezione 4

DISCUSSIONE

La colonizzazione microbica incomincia alla nascita e riveste un importante ruolo nello sviluppo sia della microflora sia della barriera intestinale e dipende da molti fattori esterni: l'allattamento al seno favorisce la crescita di bifidobatteri, mentre l'alimentazione con latte artificiale porta allo sviluppo di una microflora più complessa con meno bifidobatteri. Dopo lo svezzamento la composizione della microflora è molto simile a quella dell'adulto [Salminen, S., 1998]. La colonizzazione intestinale è coinvolta anche nella maturazione del GALT; per esempio i topi nati e mantenuti in un ambiente sterile (germ-free) mostrano numerosi difetti nella generazione di un adeguato sistema immune [Macpherson, A. J., 2004].

I probiotici sono micro-organismi vivi che, se assunti in quantità sufficiente, alterano la microflora enterica conferendo effetti benefici. I batteri a cui in genere viene associata la capacità probiotica appartengono alla famiglia dei batteri acidolattici (LAB) o dei bifidobatteri. Negli ultimi anni l'interesse nei confronti dei probiotici è sempre più in aumento, specialmente riguardo le capacità modulatorie di questi micro-organismi sul sistema immune, in particolare le proprietà immunostimolatorie *in vitro* e *in vivo* [Ouwehand A.C, 1999; Erickson, K.L, 2000]. In base ai dati presenti finora è evidente l'utilità dei probiotici come adiuvanti non specifici della risposta immune innata per aumentare le difese precoci dell'organismo in risposta alle infezioni gastro-intestinali.

Nella prima parte dello studio abbiamo dimostrato che la somministrazione di *Lactobacillus casei* in topi transgenici DQ8 in seguito ad una immunizzazione mucosale amplifica la sensibilità intestinale alla gliadina mediata da cellule T CD4+ e che l'incremento della risposta pro-infiammatoria non è associato con alcun segno di enteropatia. Il topo transgenico DQ8 rappresenta un interessante modello animale di sensibilità al glutine. Questa caratteristica è stata evidenziata in un doppio transgenico hCD4/DQ8, nullo per la classe II murina [Black KE, 2002], in cui una più alta risposta cellulo-mediata rispetto al topo hCD4/DQ6 evidenzia che la sensibilità al glutine è associata all'espressione dell'eterodimero DQ8. Tuttavia l'analisi della risposta intestinale in questa linea murina ha mostrato alti livelli di una citochina regolatoria, TGF- β ma non di IFN- γ e questo dato era rafforzato dall'istologia in quanto non c'era

alcun cambiamento nell'architettura intestinale. L'esistenza di un legame tra l'espressione del DQ8 e l'acquisizione della sensibilità al glutine è stata anche confermata in un topo transgenico per DQ8 ma con caratteristiche genetiche anche del topo NOD; questo animale sviluppa dermatite erpetiforme (DH) in seguito all'esposizione al glutine [Marietta E., 2004], ma pur avendo evidenze di DH non sviluppa enteropatia. Sulla base di questi risultati è stato utilizzato il topo transgenico DQ8, proveniente da una colonia mantenuta a dieta senza glutine e alimentato per molte generazioni con la stessa dieta, e questo ha fatto perdere all'animale la pre-esistente tolleranza alla proteina e lo ha reso predisposto ad amplificare una risposta nei confronti della gliadina [Senger S., 2005]. Studi precedenti (condotti presso i nostri laboratori) su questo modello hanno permesso di evidenziare due epitopi immunodominanti dell' α -gliadina in seguito alla immunizzazione intragastrica con una α -gliadina ricombinante; inoltre è stata anche evidenziata una produzione di IFN- γ , caratteristica quest'ultima peculiare del nostro modello, visto che la CT normalmente stimola una risposta Th2 o Th1/Th2 mista [Senger S., 2005]. Da questi risultati possiamo affermare che il modello murino, oggetto della sperimentazione è utile per gli studi correlati con la malattia celiaca, anche se ancora una volta non è stato evidenziato nessun cambiamento nell'architettura della mucosa intestinale. Per l'immunizzazione in vivo abbiamo adottato lo stesso schema di sensibilizzazione riportato da questi studi utilizzando un digesto chimotriptico della gliadina commerciale, che è una miscela di diversi componenti [Maurano F., 2001]. I risultati evidenziano una risposta mediata dalle cellule T CD4+, caratterizzata dall'espressione di IFN- γ sia nel compartimento sistemico sia in quello intestinale, ma ancora una volta senza alcuna variazione morfologica del piccolo intestino. Questi dati sperimentali, insieme con quanto riportato in letteratura sottolineano le grandi difficoltà nello sviluppo di un modello di enteropatia che presenti almeno alcune delle caratteristiche della malattia celiaca. L'induzione del danno mucosale potrebbe essere realizzata dall'aumento della risposta pro-infiammatoria specifica per l'antigene e per verificare questa ipotesi abbiamo modificato la nostra strategia di immunizzazione, aggiungendo al protocollo sperimentale di sensibilizzazione mucosale, la co-somministrazione

contemporanea per via intragastrica di un ceppo di batteri probiotici, il *Lactobacillus casei*. Le proprietà immunomodulatorie attribuite ai lattobacilli sono molteplici, includono la riduzione dell'allergia [Kim H, 2005; Shida K, 2002; Shida K, 1998; Kalliomaki M, 2001], il miglioramento delle funzioni della barriera intestinale ed effetti positivi nel trattamento di malattie autoimmuni [Maassen CB, 1999], gli effetti benefici su alcune tipologie di diarrea (da rotavirus, associate all'uso di antibiotici, da clostridium difficile e del viaggiatore) [Chermest I., 2006] e gli effetti sulle malattie infiammatorie croniche intestinali, quali morbo di Crohn e paucite [Gosselink MP, 2004; Gionchetti P, 2003; Gionchetti P, 2000]. Per quanto riguarda l'immunità attiva è riportato un tipico effetto adiuvante dei lattobacilli che si manifesta sull'immunità cellulare [Haller D, 2002; Cross ML, 2002], e in particolare *L.casei* ha mostrato effetti maggiori rispetto agli altri ceppi di *Lactobacillus* [Christensen HR, 2002; Maassen CB 2000; Pouwels PH, 1996]. Con l'utilizzo di questo probiotico abbiamo riscontrato un sinergico aumento della proliferazione cellulare in vitro in entrambi i compartimenti, sistemico e intestinale. Un aumento della risposta cellulo-mediata a seguito della somministrazione di *L.casei* che era associata con la popolazione CD4+ delle cellule T e un forte aumento dell'espressione di IFN- γ . Questi dati indicano che il ceppo probiotico può essere usato nel nostro modello come adiuvante mucosale per amplificare l'avanzante risposta immune senza alterare il fenotipo della risposta stessa. Inoltre l'analisi delle citochine nell'ambiente intestinale ha evidenziato un aumento nel livello dei trascritti Th1 e Th2 in seguito alla immunizzazione con la tossina colerica e, come conseguenza della somministrazione di *L.casei*, nei topi sensibilizzati si è manifestata una risposta di tipo Th1. In entrambi i casi, però le condizioni non sono ancora sufficienti per indurre il danno mucosale nel topo DQ8. Pertanto questi dati evidenziano l'ipotesi che una forte risposta infiammatoria mediata da cellule T e la presenza di una molecola predisponente HLA non siano condizioni sufficienti a generare il danno mucosale specifico per la gliadina riportato nella malattia celiaca, ma sono necessari ancora altri parametri; pertanto l'esacerbazione della risposta immunitaria in senso Th1 specifica per la gliadina, indotta dal trattamento con *L.casei*, non provoca il danno intestinale.

Abbiamo quindi valutato come strategia sperimentale la possibilità indurre nel nostro modello murino il blocco delle ciclo-ossigenasi, che sono gli enzimi coinvolti nella sintesi delle prostaglandine a partire dall'acido arachidonico. In particolare PGE₂ sembra esercitare un ruolo cruciale nell'omeostasi intestinale immune [Demeure CE, 1997; Snijdewint FG, 1993]. In accordo con queste evidenze, farmaci anti infiammatori non steroidei (NSAIDs), noti inibitori delle COXs sono stati associati con l'esacerbazione dell'infiammazione intestinale in pazienti con malattie infiammatorie dell'intestino [Bjarnason I, 1993]. Il ruolo delle COXs nelle malattie intestinali legate all'alimentazione è stato evidenziato da Newberry e collaboratori in topi transgenici per il TcR 3A9, che esprimono esclusivamente il TcR che riconosce il peptide HEL (hen egg-white lysozyme) 46-61, presentato su I-Ak [Newberry RD, 1999]. In seguito alla somministrazione di HEL la parte prossimale del piccolo intestino mostra un aumento della proliferazione delle cellule epiteliali delle cripte con la risultante espansione delle cripte, la proliferazione delle cellule mononucleari della lamina propria e un leggero appiattimento dei villi. Sulla base di questi dati abbiamo applicato un protocollo di somministrazione intestinale di indometacina nei topi DQ8. Poiché alla somministrazione di indometacina può essere associata una acuta infiammazione intestinale [Watanabe T, 2008], le modalità di somministrazione sono state accuratamente messe a punto sia sulla base della letteratura [Hashimoto K, 2005], sia in esperimenti preliminari durante i quali abbiamo appurato che i topi che ricevevano solo indometacina mostravano una normale istologia del piccolo intestino. Se invece l'indometacina viene somministrata negli animali sensibilizzati per via mucosale, si genera una lesione intestinale caratterizzata dalla riduzione dell'altezza dei villi, ma non associata alla iperplasia delle cripte. Questo dato risulta essere, però, secondario rispetto all'attivazione immune specifica per l'antigene in assenza di alti livelli di PGE₂, condizione già descritta nei topi COX2 -/- [Murphy E, 1996]. Tuttavia, contrariamente a quanto descritto per i topi 3A9 [Newberry RD, 1999], l'inibizione delle COXs non stimola alcun aumento della proliferazione delle cellule T specifiche per l'antigene. Inoltre l'esacerbazione della risposta immune specifica per la gliadina, dovuta alla co-somministrazione di un ceppo di probiotico, non amplifica il grado della lesione

mucosale nei topi trattati con l'indometacina. Infatti i nostri dati indicano chiaramente che la riduzione dell'altezza dei villi è più direttamente associata con una disregolazione della regolare immunità mucosale indotta dalla gliadina. Infatti, a seguito dell'inibizione delle COX, abbiamo riscontrato un forte aumento nei livelli basali delle citochine pro-infiammatorie IFN- γ e TNF- α negli animali immunizzati. Abbiamo anche evidenziato una significativa riduzione dell'espressione dell'IL-2 specifica per la gliadina, e questo contribuisce allo scompaginamento dell'ambiente intestinale. Quest'ultima condizione potrebbe essere un valido aiuto per spiegare le variazioni riscontrate a livello della lamina propria dei topi con enteropatia: aumento dell'apoptosi e aumentata espressione di CD25. Infatti nei topo IL-2 -/- è stato riscontrato un aumentato rapporto tra cellule immuni naïve e cellule immuni attivate e, in assenza di continua stimolazione antigenica, le cellule T attivate muoiono a causa della mancanza di citochine nel loro microambiente [Gaffen SL, 2004]. Ulteriori studi specifici sono ancora necessari riguardo questo aspetto. E' interessante sottolineare che l'utilizzo di questo protocollo sperimentale non influenza il ricambio (turn-over) delle cellule epiteliali in quanto non è stato riportato un aumento nella proliferazione delle cellule delle cripte o l'apoptosi degli enterociti. La persistente integrità dell'epitelio intestinale nei topi trattati è anche spiegata dalla perdita della relazione tra il decremento ponderale e il danno. In particolare, nei topi che mostravano enteropatia e che erano stati trattati con *L.casei* non è stato registrato alcun calo di peso. Abbiamo, invece, notato che il decremento ponderale è strettamente associato alla somministrazione di indometacina. Inoltre l'analisi delle proteine del siero ha indicato che l'indometacina stessa ha alterato altri parametri, che non sono stati ulteriormente modificati dalla sensibilizzazione con la gliadina. Questi risultati suggeriscono che gli effetti mediati dalla gliadina sono limitati al piccolo intestino, in particolare la riduzione dei villi è associata con gli eventi cellulari e molecolari che si registrano a livello della lamina propria.

Per evidenziare i meccanismi biochimici che hanno stimolato l'enteropatia, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul profilo dei geni che partecipano al rimodellamento tessutale. In particolare abbiamo esaminato il profilo di espressione di

84 geni che appartengono alla ECM e all'insieme delle molecole di adesione cellulare. Tra tutti questi geni, solo 4 hanno mostrato un rapporto di espressione maggiore di 3.0 nei topi sensibilizzati a seguito dell'inibizione delle COX. Più specificamente, i livelli di mRNA di Mmp7 e Mmp8, che codificano per due metallo-proteinasi (Mmps) di matrice risultavano aumentati, mentre quelli di Mmp13 risultavano specificamente soppressi. Le Mmps sono un sottogruppo della famiglia di metallo-proteinasi zinco-dipendenti e degradano essenzialmente tutti i componenti dei tessuti connettivi [Birkedal-Hansen H, 1993]. L'espressione della maggior parte delle Mmps ha una regolazione trascrizionale [Yan C, 2007]. Inoltre le loro attività proteolitiche sono controllate in maniera precisa ad opera dei loro precursori nella fase di attivazione e ad opera di inibitori endogeni durante la fase di inibizione, quali α -macroglobuline e tessuti inibitori delle metallo-proteinasi (TIMPs) [Nagase H, 1999]. Va sottolineato che la zimografia ha confermato che le attività enzimatiche di Mmp7 e Mmp13, ma non di Mmp8 hanno una regolazione trascrizionale nei topi con enteropatia. Dall'altro lato le attività di MMP1 e MMP2, i cui livelli di trascritti sono risultati invariati, erano invece amplificati in questo gruppo sperimentale. Nell'epitelio confinante con le ulcerazioni del piccolo intestino, è stato riscontrato un aumento nell'espressione di queste Mmps [Saarialho-Kere UK, 1996], in linea con i nostri dati. E' importante menzionare che l'attivazione delle Mmps è stata anche descritta nella malattia celiaca; in particolare l'analisi dell'espressione genica indica aumentati livelli di mRNA di Mmp1 e Mmp12 [Ciccocioppo R, 2005], mentre in un altro studio i livelli proteici di Mmp1, Mmp3 e Mmp9 risultavano aumentati [Mohamed BM, 2006]. Chiaramente esistono delle discrepanze tra i nostri dati e quelli riportati nell'uomo, che possono essere dovuti alla specie-specificità dell'insieme delle metallo-proteinasi coinvolte nella realizzazione del rimodellamento tessutale.

Anche la regolazione di altri due geni appartenenti alla famiglia ECM risulta aumentata nei topi con enteropatia, Adamts2 e Lamb3. La procollagene N-proteinasi (ADAMTS2) catalizza il taglio specifico del procollagene non denaturato. L'espressione di questo enzima extracellulare consiste, essenzialmente, nella generazione delle fibrille per la normale resistenza alla trazione e stabilità metabolica. I geni Adamts sono

normalmente espressi a bassi livelli nei tessuti adulti [Tang BL: 2001], di conseguenza l'aumento della regolazione di Adamts2 nei topi DQ8 potrebbe essere utile nell'implementare il normale ricambio metabolico durante il processo di riparazione del collagene. L'attivazione di Lamb3, un gene che codifica per la sub unità $\alpha 3$ della laminina, è stato trovato nel ripristino delle ferite epiteliali intestinali [Lotz MM, 1997], cioè nella riparazione delle interruzioni nel rivestimento delle mucose del tratto gastrointestinale [Moore R, 1989]. In questo processo le cellule epiteliali dalle estremità delle ferite migrano verso la zona danneggiata, dove rapidamente ripristinano i contatti cellulari e ristabiliscono la funzione di barriera. Inoltre è stato riportato che la proteina LAMB3 è trascrizionalmente regolata [Kita Y, 2008] e l'induzione del gene Lamb3 potrebbe essere coinvolta nel complesso processo dell'enteropatia nel topo transgenico DQ8, contribuendo alla perdita dell'alterazione del compartimento enterocitico che abbiamo riscontrato. Quindi in questa seconda fase dello studio abbiamo dimostrato che l'induzione di una sensibilità intestinale alla gliadina, in associazione con l'inibizione delle cicloossigenasi, causa un danno mucosale nel topo transgenico DQ8.

Durante la fase successiva del lavoro sperimentale sono stati analizzati altri ceppi probiotici e sono state effettuate valutazioni *in vivo* e *in vitro*. L'attività immunomodulatoria dei probiotici è sicuramente l'aspetto maggiormente indagato, in particolare l'espressione di citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie stimulate da questi micro-organismi sia a livello sistemico che mucosale. Generalmente i lattobacilli che colonizzano la mucosa gastrointestinale sono potenti induttori di IL-12 [Hessle C, Hanson L.A and WOLD A.E. 1999]. L'interleuchina 12 è un fattore importante critico per la commutazione delle cellule T naïve o della memoria verso risposte di tipo Th1, cioè risposte pro-infiammatorie che portano ad una forte immunità contro le infezioni e altre malattie [Manetti, R., 1993; Seder, R. A., 1993; Hsieh, C. S., 1993; Macatonia, S. E.,1995]

La somministrazione dei probiotici nel nostro modello animale, il topo DQ8, ha mostrato, in entrambi i compartimenti analizzati, un significativo aumento della produzione di IFN- γ per *L.casei*, confermando l'adiuvantività di questo ceppo; mentre

per gli altri probiotici non c'è stato nessun effetto significativo. I livelli di TNF- α sono, invece, aumentati con la somministrazione di *L.paracasei* e *L.plantarum*, in entrambi i compartimenti analizzati. Questi due probiotici hanno mostrato lo stesso effetto anche nel modello sperimentale *in vitro*, le cellule dendritiche prelevate da midollo osseo di topo DQ8. In questo modello cellulare l'incubazione con i probiotici induce la maturazione delle cellule stesse, che si manifesta con l'aumento della produzione della molecola co-stimolatoria CD86, e l'induzione di un profilo citochinico pro-infiammatorio; tuttavia gli effetti generati dai diversi ceppi sono differenti e dipendono dalla specificità del ceppo. In realtà nella produzione di citochine esistono delle differenze specifiche per i ceppi di probiotici.

Gli effetti dei probiotici sono stati documentati anche mediante esperimenti sull'uomo. In uno studio condotto su individui adulti, la somministrazione di yoghurt (450gr al dì) per quattro mesi in 24 volontari ha incrementato, in modo statisticamente significativo, la produzione di IFN- γ dai linfociti T isolati e l'attività delle cellule NK [Halpern GM, 1991]. In un altro studio condotto su volontari, il *Lactobacillus* (LGG) ha aumentato la risposta dei linfociti T CD4+ a componenti batterici intestinali e la secrezione di citochine anti-infiammatorie (IL-10, IL-4), riducendo le citochine proinfiammatorie (TNF α , IL-6, IFN- γ) [Schulz M, 2003]. Ricerche su bambini atopici hanno confermato la capacità del lattobacillo (LGG) di aumentare i livelli di IL-10 e TGF- β [Pessi T, 2000; Rautava S, 2002].

La capacità dei lattobacilli di stimolare una risposta cellulo-mediata può indurre ad assumere che questi probiotici possono essere utilizzati come adiuvanti e vettori per i vaccini [Pouwels PH, 1996; Gerritse K, 1990; Bloksma N, 1979; Wells JM, 1996].

Inoltre poiché l'infiammazione intestinale è accompagnata da un disequilibrio della microflora intestinale, i probiotici potrebbero essere utilizzati come strumento innovativo per trattare la disfunzione della barriera intestinale, includendo gastroenteriti acute, allergie alimentari e malattie infiammatorie intestinali [Salminen S, 1998].

CONCLUSIONI

Lo studio condotto ha portato a delle interessanti conclusioni applicative.

1. Abbiamo dimostrato che in un modello murino di ipersensibilità specifica per la gliadina *L.casei* manifesta una attività adiuvante mediata da cellule T CD4+. Questa caratteristica è stata confermata recentemente da altri studi, indicando una immunità protettiva contro *Salmonella* in seguito alla somministrazione di un *L.casei* ricombinante esprime l'antigene flagellare [Kajikawa A, 2007]. Abbiamo anche dimostrato che *L.casei* somministrato in una condizione di forte infiammazione intestinale (quale quella indotta dal blocco delle ciclo-ossigenasi) non aumenta il danno mucosale. Questi risultati enfatizzano il ruolo potenzialmente importante di *L.casei* come co-adiuvante nei vaccini, dal momento che promuove maggiormente risposte da parte di cellule T, attraverso un fenotipo Th1.

2. Abbiamo inoltre dimostrato che l'induzione di una sensibilità intestinale alla gliadina, in associazione con l'inibizione delle cicloossigenasi, causa un danno mucosale nel topo transgenico DQ8.

3. L'utilizzo dei probiotici *in vivo* ed *in vitro* ha mostrato, nei nostri modelli sperimentali, una forte specificità dipendente dal ceppo utilizzato, nell'induzione della risposta immunitaria, che tuttavia si attua in senso Th1. In particolare si conferma l'utilità di *L.casei* per incrementare la risposta immune cellulo-mediata e la produzione antigene-specifica di IFN γ .

Al momento il nostro è il primo lavoro riguardo una enteropatia intestinale stimolata dalla gliadina in topi che ricordano alcuni aspetti della malattia celiaca. In particolare abbiamo dimostrato che la restrizione HLA, insieme con una sbilanciata sensibilità intestinale Th1 alla gliadina conduce all'accorciamento dei villi, ma questa condizione non è sufficiente per causare l'iperplasia delle cripte e l'espansione dei linfociti intraepiteliali osservata nella malattia umana [Sollid LM., 2002]. Inoltre la citolisi indotta dal recettore dello strato epiteliale sembra essere mediata dai linfociti intraepiteliali espansi e attivati [Sollid L., 2004, 21:303-304] e potrebbe essere

responsabile dell'apoptosi degli enterociti e dell'atrofia dei villi nella malattia celiaca [Branski D, 2006]. Questi studi, insieme, evidenziano un ruolo dei meccanismi di immunità innata nella malattia celiaca, che non sono appropriatamente stimolati nel nostro modello. In particolare l'IL-15 secreta dalle cellule epiteliali appare essere il fattore cruciale che dirige la selettiva espansione dei linfociti intraepiteliali [Jabri B, 2000]. Inoltre l'induzione di questa citochina potrebbe essere utile nel topo DQ8 per amplificare il grado di danno mucosale mediante il coinvolgimento dei linfociti intraepiteliali; per assolvere questo dubbio, abbiamo in prospettiva pianificato specifici esperimenti in questo topi per indagare ulteriormente gli aspetti della patogenesi della malattia celiaca, nonché per analizzare strategie immunomodulatorie alternative alla dieta senza glutine.

Sezione 4
BIBLIOGRAFIA

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.. *Immunologia Cellulare e molecolare*, 2002, 4° ed– W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania;

Abbas A.K.,. Murphy K.M., Sher A.. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-793;

Alam R., and Gorska M. 3. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S476-485;

Arvola T., Laiho K., Torkkeli S., Mykkänen H., Salminen S., Maunula L., Isolauri E.. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics* 1999; 104 (5), e64;

Asahara T., Nomoto K., Shimizu K., Watanuki M., Tanaka R.. Increased resistance of mice to *Salmonella enterica serovar Typhimurium* infection by synbiotic administration of bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 91: 985-996;

Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S., von Wright, A. eds. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 1998, 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1-72;

Ballongue J. *Bifidobacteria* and probiotic action. In: In Salminen, S., von Wright, A. eds. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 1998, 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 519-587;

Bancherau J, Steinman, RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52;

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B. and Palucka K.. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811;

Bellanti J.A., Sabra A. and Zeligs B.J.. Gastrointestinal immunopathology and food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93: S26-32;

- Bennet R.G.**, Sherwood Gorbach, S.L., Goldin, B.R., Chang, T.W., Laughon, B.E., Greenough, W.B., Bartlett, J.G. Treatment of relapsing *Clostridium difficile* diarrhea with *Lactobacillus* GG. *Nutrition Today* 1996; 31(Suppl), 35S-38S;
- Birkedal-Hansen H.**, Moore W.G.I., Bodden M.K., Windsor J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler J.A.. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993, 4:197-250;
- Bjarnason I.**, Hayllar J., MacPherson A.J, Russell A.S.. Side effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology* 1993; 104: 1832-1847;
- Björkstén B.**, Naaber P., Sepp E. and Mikelsaar M.. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 342-346;
- Black K.E.**, Murray J.A., David C.S.. HLA-DQ determines the response to exogenous wheat proteins: a model of gluten sensitivity in transgenic knockout mice. *J Immunol* 2002; 169: 5595–600].
- Bloksma N.**, de Heer E., van Dijk H. et al.. Adjuvanticity of lactobacilli. I. Differential effects of viable and killed bacteria. *Clin Exp Immunol* 1979; 37: 367–75;
- Brandtzaeg P.**, Farstad I.N., Johansen F.E., Morton H.C., Norderhaug I.N. and Yamanaka T.. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev* 1999; 171: 45-87;
- Brandtzaeg P.**, Halstensen T.S., Kett K., Krajci P., Kvale D., Rognum T.O., Scott H and Sollid LM. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 1989; 97: 1562-1584;
- Brandtzaeg P.**.. Nature and function of gastrointestinal antigen-presenting cells. *Allergy* 2001; 56: 16-20;
- Branski D.**, Fasano A., Troncone R.. Latest developments in the pathogenesis and treatment of celiac disease. *J Pediatr* 2006; 149: 295-300;

Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., et al.. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances t cell stimulatory capacity:T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-52;

Chapat L., Chemin K., Dubois B., Bourdet-Sicard R. and Kaiserlian D.. *Lactobacillus casei* reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2520-2528;

Cehade M. and Mayer L.. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 3-12;

Cheng S., Baisch J., Krco C., Savarirayan S., Hanson J., Hodgson K., et al. Expression and function of HLA-DQ8 (DQA1*03101/DQB1*0302)genes in transgenic mice. *Eur J Immunogenet* 1996; 23: 15–20;

Chermest I., Eliakim R.. Probiotics and the gastrointestinal tract: where are we in 2005? *World J Gastroenterol*, 2006; 14; 12(6): 853-857;

Christensen H.R., Frokiaer H. and Pestka J.J.. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168 :171-178;

Ciccocioppo R., Di Sabatino A., Bauer M., Della Riccia D.N., Bizzini F., Biagi F., Cifone M.G., Corazza G.R., Schuppan D.. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest* 2005; 85: 397-407;

Cross M.L., Mortensen R.R., Kudsk J., Gill H.S.. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191: 49–53;

de Roos N.M., Katan, M.B.. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 71: 405-411;

Debard N., Sierro F., Browning J., Kraehenbuhl J.P. Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse Peyer's patches. *Gastroenterology* 2001; 120: 1173-82;

Delcenserie V., Martel D., Lamoureux M., Amiot J., Buotin Y. and Roy D., Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract – *Curr Issues Mol Biol*, 2008, 10: 37-54;

Demeure C.E., Yang L.P., Desjardins C., Raynauld P., Delespesse G. Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* 1997; 27:3526-3531;

Dunne C., Murphy L., Flynn S., O'Mahony L., O'Halloran S., Feeney M., Morrissey D., Thornton, G., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., Quigley E.M.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Kevin, J. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999, 76: 279-292;

Ebert L.M., Schaerli P., Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol.* 2004; 42(7): 799-809;

Erickson K.L and Hubbard N. E., Probiotics: immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 2000; 130: s403-s409;

Fearon D.L, Locksley R.M. The instructive role of the innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272: 50-54;

Fernandes C.F., Shahani K.M., Amer, M.A. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilli fermented dairy products. *FEMS Microbiology Reviews* 1987; 46: 343-356;

Fujiwara S., Hashiba H., Hirota T., Forstner J. Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor ganglioside GM1 on the cell surface. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 67: 97-106;

Fujiwara S., Seto Y., Kimura A., Hashiba H. Establishment of orally administered *Lactobacillus gasseri* SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 90: 343-352;

Fujiwara S., Seto Y., Kimura A., Hashiba H. Intestinal transit of an orally administered streptomycin-rifampicin-resistant variant of *Bifidobacterium longum* SBT2928: its long-term survival and effect on the intestinal microflora and metabolism. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 90: 43-52;

Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991; 32: 439–42

Gaffen S.L., Liu K.D.. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 2004, 28:109-123;

Gerritse K., Posno M., Schellekens M.M.. et al. Oral administration of TNP–*Lactobacillus* conjugates in mice: a model for evaluation of mucosal and systemic immune responses and memory formation elicited by transformed lactobacilli. *Res Microbiol* 1990; 141: 955–62;

Gionchetti P., Rizzello F., Helwig U., Venturi A., Lammers K.M., Brigidi P., Vitali B., Poggioli G., Miglioli M., Campieri M.. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 2003; 124: 1202-1209;

Gionchetti P., Rizzello F., Venturi A., Brigidi P., Matteuzzi D., Bazzocchi G., Poggioli G., Miglioli M., Campieri M.. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119: 305-309;

Goldin B.R., Salminen S.. Lactic acid bacteria and gut mucosal barrier function. *Gastroenterology International* 1998; 11 (Suppl 1): 69-73;

Gosselink M.P., Schouten W.R., va Lieshout L.M., Hop W.C., Laman J.D., Ruseler-van Embden J.G.. Delay of the first onset of pauchitis by oral intake of prbiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 876-884;

Grönlund M.M., Lehtonen O.P., Eerola E. and Kero P.. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 19-25;

Haller D., Bode C., Hammes W.P., Pfeifer A.M., Schiffrin E.J. and Blum S., Non pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocytes co-cultures, *Gut* 2000, 47: 79-87;

Haller D., Serrant P., Granato D., Schiffrin E.J., Blum S. Activation of human NK cells by staphylococci and lactobacilli requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 649–57;

Halpern G.M., Vruwink K.G., Van de Water J., et al. Influence of long-term yoghurt consumption in young adults. *Int J Immunotherapy* 1991; 7: 205-210;

Harmsen H.J., Wildeboer-Veloo A.C., Raangs G.C., Wagendorp A.A., Klijn N., Bindels J.G. and Welling G.W.. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30 :61-67;

Hashimoto K., Sheller J.R., Morrow J.D., Collins R.D., Goleniewska K., O'Neal J., Zhou W., Ji S., Mitchell D.B., Graham B.S., Peebles R.S. Jr. Cyclooxygenase Inhibition Augments Allergic Inflammation through CD4-Dependent, STAT6-Independent Mechanisms. *J Immunol* 2005, 174: 525-532;

He F., Morita H., Hashimoto H., Hosoda M., Kurisaki J., Ouwehand A.C., Isolauri E., Benno Y. and Salminen S.. Intestinal *Bifidobacterium* species induce varying cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 1035-1036;

He, F., Morita H., Ouwehand A.C., Hosoda M., Hiramatsu M., Kurisaki J., Isolauri E., Benno Y., and Salminen S.. Stimulation of the secretion of proinflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. *Microbiol Immunol* 2002; 46:781-785;

Heiligenhaus A, Li HF, Yang Y, Wasmuth S, Steuhl KP, Bauer D: Transplantation of Amniotic Membrane in Murine Herpes Stromal Keratitis Modulates Matrix Metalloproteinases in the Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 4079-4085;

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740–745;

Hessle C, Hanson L.A and WOLD A.E. Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 276–282;

Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 41: 85-101;

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR-4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162: 3749–3752;

Hsieh C.S., Macatonia S.E, Tripp C.S, Wolf S.F, O'Garra A, and Murphy K.M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547-52;

Isolauri E., Arvola T., Sütas Y., Moilane E., Salminen S.. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy* 2000; 30: 1604-1610;

Isolauri E., Majamaa H., Arvola T., Rantala I., Virtanen E. and Arvilommi H. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 1993, 105:1643-50;

Iwasaki A., and Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5:987-995;

Jabri B., de Serre N.P., Cellier C., Evans K., Gache C., Carvalho C., Mougenot J.F., Allez M., Jian R., Desreumaux P., Colombel J.F., Matuchansky C., Cugnenc H., Lopez-Botet M., Vivier E., Moretta A., Roberts A.I., Ebert E.C., Guy-Grand D., Brousse N., Schmitz J., Cerf-Bensussan N: Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in coeliac disease. *Gastroenterology* 2000, 118:867-879;

Janeway C.A. Jr. The immune system evolved to discriminate infectious non self from noninfectious self. *Immunol Today* 1992; 13: 11–16;

Janeway C.A. Jr., and Medzhitov R., Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216;

Jump R.L., Levine A.D., Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 462-478;

Kaila M., Isolauri E., Nutritional management of acute diarrhea. *Nutrition Today* 1996, 31 (Suppl), 16S-18S;

Kajikawa A., Satoh E., Leer R.J., Yamamoto S., Igimi S. Intra-gastric immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vaccine* 2007; 25: 3599–605;

Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076–9;

Kapsenberg M.L., Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:984-93;

Kim H., Kwack K., Kim D.Y., Ji G.E. Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45(2): 259–67;

Kishi A., Kazuko U., Matsubara Y., Okuda C., Kishida T. Effect of oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. *Coagulans* on interferon-alpha producing capacity of humans. *Journal of the American College of Nutrition* 1996; 15: 408-412;

Kita Y., Mimori K., Tanaka F., Matsumoto T., Haraguchi N., Ishikawa K., Matsuzaki S., Fukuyoshi Y., Inoue H., Natsugoe S., Aikou T., Mori M.: Clinical significance of LAMB3 and COL7A1 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2008, 8;

Lee Y.K., Salminen S. The coming age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1995; 6: 241-5;

Link-Amster H., Rochat F., Saudan K.Y., Mignot O., Aeschlimann J. M. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1994; 10: 55-64;

Lotz M.M., Nusrat A., Madara J.L., Ezzell R., Wewer U.M., Mercurio A.M.: Intestinal epithelial restitution. Involvement of specific laminin isoforms and integrin laminin receptors in wound closure of a transformed model epithelium. *Am J Pathol* 1997; 150: 747-760;

Lutz M.B., Kukutsch N., Ogilvie A.L., Rossner S., Koch F., Romani N., et al.. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 1999; 223: 77–92;

Maassen C.B.M., van Holten-Neelen C., Balk F., Heijne den Bak-Glashouwer M.J., Leer R.J., Laman J.D., Boersma W.J.A., Claassen E.. Straindependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* 2000; 18: 2613-2623;

Maassen CB, Laman JD, den Bak-Glashouwer MJ, Tielen FJ, van Holten-Neelen JC, Hoogteijling L, et al. Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* 1999; 17: 2117–28;

Macatonia S.E., Hosken N.A, Litton M., Vieira P., Hsieh C. S., Culpepper J.A, Wysocka M., Trinchieri G., Murphy K.M., and O'Garra A.. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* 1995; 154: 5071-79;

MacDonald TT. The mucosal immune system. *Parasite Immunol* 2003; 25: 235-246;

Macpherson A. J., and Harris N.L.. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 478-85;

Maeda Y, Noda S, Tanaka K, Sawamura S, Aiba Y, Ishikawa H, Hasegawa H, Kawabe N, Miyasaka M and Koga Y. The failure of oral tolerance induction is functionally coupled to the absence of T cells in Peyer's patches under germfree conditions. *Immunobiology* 2001; 204: 442-457;

Majamaa, H., Isolauri, E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1997; 99: 179-185;

Manetti R., Parronchi P., Giudizi M.G., Piccinni M.P., Maggi E., Trinchieri G., and Romagnani S.. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 (IL-12)) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* 1993; 177: 1199-1204;

Marietta E., Black K., Camilleri M., Krause P., Rogers III R.S., David C., et al.. A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. *J Clin Invest* 2004; 114: 1090-7;

Matricardi P.M., Rosmini F., Riondino S., Fortini M., Ferrigno L., Rapicetta M. and Bonini S. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *Bmj* 2000; 320: 412-417;

Matsuzaki T., and Chin J.. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol* 2000; 78:67-73;

Mattila-Sandholm T., Blum S.. et al. Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Science Technology* 1999; 10: 393-399;

Maurano F., Siciliano R.A., De Giulio B., Luongo D., Mazzeo M.F., Troncone R., et al. Intranasal administration of one alpha gliadin can down-regulate the immune response to whole gliadin in mice. *Scand J Immunol* 2001; 53: 1–7;

Mayer L. Mucosal immunity. *Pediatrics* 2003; 111: 1595-1600;

McCarthy J., O'Mahony L., O'Callaghan L., Sheil B., Vaughan E.E., Fitzsimons N., Fitzgibbon J., O'Sullivan G.C., Kiely B., Collins J.K. and Shanahan F. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 2003; 52: 975-980;

Medzhitov R., and Janeway C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91: 295–298;

Medzhitov R., Janeway C. Jr. Innate immunity. *N Eng J Med* 2000; 343: 338-344;

Medzhitov R., Janeway C. Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 4–9

Metha Damani A., Markowicz S., Engleman E.G.. Generation of antigen-specific CD8+CTLs from naive precursors. *J Immunol* 1994; 153: 996-1003;

Miettinen M., Matikainen S., Vuopio-Varkila J., Pirhonen J., Varkila K., Kurimoto M., Julkunen I. *Lactobacilli* and *streptococci* induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity* 1998; 66: 6058-6062;

Miettinen M., Vuopio-Varkila J., Varkila K. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection and Immunity* 1996; 64: 5403-5405;

Miniello VL, Granieri L, Tarantino M, Amenio L. Alimenti funzionali: i prebiotici. *Riv It Ped*, 2001; 27: 323-327;

Mohamed B.M., Feighery C., Kelly J., Coates C., O'Shea U., Barnes L., Abuzakouk M. Increased protein expression of matrix metalloproteinases -1, -3, and -9 and TIMP-1 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1862-1868;

Moore R., Carlson S., Madara J.L. Rapid barrier restitution in an in vitro model of intestinal epithelial injury. *Lab Invest* 1989; 60: 237-244;

Moser M., Murphy K.M., *Nat. Immunol* 2000; 1: 199-205;

Mowat A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 331-341;

Mowat A.M., Viney J.L. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunological review*, 1997; 156: 145-166;

Murosaki S., Yamamoto Y., Ito K., Inokuchi T., Kusaka H., Ikeda H., Yoshikai Y. Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998; 102: 57-64;

Murosaki S., Yamamoto Y., Ito K., Inokuchi T., Kusaka H., Ikeda H. and Yoshikai Y.. Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 57-64;

Murphy E., Shibuya K., Hosken N., Openshaw P., Maino V., Davis K., Murphy K., O'Garra A. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long term stimulation. *J Exp Med* 1996; 183: 901-913;

Nagase H., Woessner Jr J.F. Matrix Metalloproteinases. *Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494;

Neumann B., Luz A., Pfeffer K., Holzmann B., Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55kD receptor for tumor necrosis factor. *J. Exp. Med* 1996; 184:259-264;

Newberry R.D., Stenson W.F., Lorenz R.G. Cyclooxygenase-2 dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. *Nat Med* 1999; 5: 900-906;

Orrhage K., Sjöstedt S., Nord C.E.. Effect of supplements with lactic acid bacteria and oligofructose on the intestinal microflora during administration of cefpodoxime proxetil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; 46: 603-611;

Ouwehand A.C., Isolauri E., He F., Hashimoto H., Benno Y. and Salminen S.. Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 144-145;

Ouwehand A.C., Kirijavainen P.V., Shortt C. and Selminen E.. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 1999; 9: 43-53;

Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13766–13771;

Palucka K., and Banchereau J.. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 420-431;

Peña J.A. and Versalovic J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol* 2003 ; 5: 277-285;

Pene J., Rousset F., Briere F., Chretien I., Bonnefoy J.Y., Spits H., Yokota T., Arai N., Arai K., Banchereau J. and et al. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6880-6884;

Perdigon G., de Macias M.E., Alvarez S., Oliver G., de Ruiz Holgado A.A.. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 1988; 63: 17–23 ;

- Perdue M.H.** Mucosal immunity and inflammation. III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol* 1999; 277: G1-5;
- Pessi T.**, Sütas Y., Hurme M., Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clinical and Experimental Allergy* 2000; 30: 1804-1808;
- Pessi T.**, Sütas Y., Saxelin M., Kallioinen H., Isolauri E.. Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65: 4725-4728;
- Poltorak A.**, He X., Smirnova I., et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085–2088;
- Pouwels PH**, Leer RJ, Boersma WJ. The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *J Biotechnol* 1996; 44: 183–92
- Probert H.M.**, Gibson GR. Bacterial microfilms in the human gastrointestinal tract, *Curr Issues Intest Microbiol*, 2002; 3: 23-27;
- Pulendran B.**, Banchereau J., Maraskovsky E., Maliszewski C, *Trends Immunol.* 2001; 22: 41-47;
- Rautava S.**, Kalliomaki M., Isolauri E.. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 119-21;
- Roitt I.**, Brostoff J and Male D . Immunologia, Zanichelli, 2003;
- Rolfe R.D.** Colonization resistance. In: Mackie, R. I., White, B. A., Isaacson, R. E., eds. *Gastrointestinal Microbiology Vol 2: Gastrointestinal microbes and host interactions.* Chapman & Hall, New York, 1997, 501-536

- Saarialho-Kere U.K.**, Vaalamo M., Puolakkainen P., Airola K., Parks W.C., Karjalainen-Lindsberg M.L. Enhanced expression of matrilysin, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers. *Am J Pathol* 1996; 148: 519-526;
- Salminen S.**, Bouley C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J.H., Franck A., Gibson G.R., Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M., and Rowland I.. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998; 80: Suppl 1:S147-71;
- Schulz M.**, Linde H.J., Lehn N., et al. Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. *J Dairy Research* 2003; 70: 165-73;
- Seder R.A.**, Gazzinelli R., Sher A., and Paul W.E.. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 10188-192;
- Senger S.**, Maurano F., Mazzeo M.F., Gaita M., Fierro O., David C.S., et al. Identification of immunodominant epitopes of alpha-gliadin in HLA-DQ8 transgenic mice following oral immunization. *J Immunol* 2005; 175: 8087–95;
- Shapiro S.Z.**, Black S.J.. Identification of an acute-phase reactant in murine infections with *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun* 1992; 60: 3921-3924;
- Shida K.**, Makino K., Morishita A., Takamizawa K., Hachimura S., Ametani A., Sato T., Kumagai Y., Habu S. and Kaminogawa S.. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115: 278-287;
- Shida K.**, Takahashi R., Iwadate E., Takamizawa K., Yasui H., Sato T., et al. *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(4): 563–70;

- Snijdewint F.G.**, Kalinski P., Wierenga E.A., Bos D., Kapsenberg M.L.. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol* 1993; 150: 5321-5329;
- Sollid L.** Intraepithelial lymphocytes in celiac disease: license to kill revealed. *Immunity* 2004, 21: 303-304
- Sollid L.M.** Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 647-655;
- Steinman R.M.** and Nussenzweig, M. C., Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 351-358;
- Sudo N.**, Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C. and Koga Y.. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997; 159: 1739-1745;
- Tang B.L.** ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 33-44;
- Tejada-Simon M.V.**, Lee J.H., Ustunol Z., and Pestka J.J. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J Dairy Sci* 1999; 82: 649-660;
- Van Niel C.W.**, Feudtner C., Garrison M.M., Christakis D.A. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2002; 109: 678-694
- Van Niel C.W.**, Garrison M., Feudtner C. et al. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a metaanalysis. *Pediatrics* 2002; 109: 678-684;
- Vollaard E.J.**, and Clasener H.A.. Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 409-414;

von der Weid T., Bulliard C. and Schiffrin E.J.. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4(+) T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 695-701;

Watanabe T., Higuchi K., Kobata A., Nishio H., Tanigawa T., Shiba M., Tominaga K., Fujiwara Y., Oshitani N., Asahara T., Nomoto K., Takeuchi K., Arakawa T.. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut* 2008; 57: 181-187;

Wells J.M., Robinson K., Chamberlain L.M. et al. Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 70: 317–30

Wershil BK., and Furuta G.T. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology* 2008; 121 (2): s380-s383].

Yan C., Boyd D.D.. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007; 211: 19-26;

Sezione 6

PUBBLICAZIONI

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI PRODOTTE DURANTE IL TRIENNIO

1. **D'Arienzo R**, Maurano F, Mazzarella G, Luongo D, Stefanile R, Ricca E, Rossi M. Bacillus subtilis spores reduce susceptibility to *Citrobacter rodentium*-mediated enteropathy in a mouse model. *Res Microbiol*. 2006 Nov;157(9):891-7
2. Russo M, Nigro P, Rosiello R, **D'Arienzo R**, Russo GL. Quercetin enhances CD95- and TRAIL-induced apoptosis in leukemia cell lines. *Leukemia*. 2007 May;21(5):1130-3.
3. Bergamo P, Maurano F, **D'Arienzo R**, David C, Rossi M. Association between activation of phase 2 enzymes and down-regulation of dendritic cell maturation by c9,t11-conjugated linoleic acid. *Immunol Lett*. 2008 May 15;117(2):181-90.
4. **D'Arienzo R**, Maurano F, Luongo D, Mazzarella G, Stefanile R, Troncone R, Auricchio S, Ricca E, David C, Rossi M. Adjuvant effect of Lactobacillus casei in a mouse model of gluten sensitivity. *Immunol Lett*. 2008 Aug 15;119(1-2):78-83
5. **D'Arienzo R**, Stefanile R., Maurano F., Luongo D., Bergamo P., Mazzarella G., Troncone R., Auricchio S., David C., and Rossi M. Intestinal gliadina sensitività mediated by cyclooxygenase inhibition causes enteropathy in DQ8 transgenic mice - – SUBMITTED.
6. **D'Arienzo R**, Maurano F., Lavermicocca P., Ricca E., and Mauro Rossi. Differential modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity – IN PROGRESS