



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA AMBIENTALE E SANITA' PUBBLICA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN TERRITORIO AMBIENTE,

RISORSE E SALUTE

INDIRIZZO MEDICINA AMBIENTALE NUTRIZIONE E INQUINAMENTO

XXIII CICLO

MODIFICAZIONE DELLA FLORA INTESTINALE E OBESITA': POSSIBILE RUOLO DI RESISTIN LIKE MOLECULE BETA (RELM β)

DIRETTORE DELLA SCUOLA: CH.MO PROF. MARIO ARISTIDE LENZI

COORDINATORE D'INDIRIZZO: CH.MO PROF. BRUNO SAIA

SUPERVISORE: CH.MO PROF. DIEGO MARTINES

CORRELATORE: CH.MO PROF. IGNAZIO CASTAGLIUOLO

DOTTORANDA: DOTT.SSA DONATELLA CAVALLO

INDICE

ABSTRACT	6
RIASSUNTO	8
INTRODUZIONE	10
1. Obesità	10
1.1. Metodi di misura dell'obesità	10
1.2. Eziologia dell'obesità	11
1.3. Approcci terapeutici	12
2. Flora batterica intestinale	15
2.1. Sviluppo della microflora intestinale umana	15
2.2. Distribuzione della microflora nel tratto intestinale dell'adulto	16
2.3. Composizione della microflora nel tratto intestinale dell'adulto	17
2.4. Funzioni della flora batterica intestinale	18
2.5. Fattori che influenzano l'ecosistema intestinale	19
3. Obesità e flora batterica intestinale	20
4. Il sistema immunitario innato del tratto gastrointestinale e meccanismi di difesa dell'organismo	21
4.1. Barriera mucosale intestinale e GALT	21
4.1.1. Peptidi antimicrobici endogeni: le cellule del Paneth	22
4.1.2. Il GALT	23
4.2. Recettori TLR	25
5. Probiotici	27
5.1. Meccanismi d'azione proposti per i probiotici	27
5.2. Indicazioni cliniche dei probiotici in gastroenterologia	29
5.3. Il genere <i>Lattobacillus</i>	30

5.4. <i>Lactobacillus crispatus</i> M247	30
6. Resistin like molecule beta (RELMβ)	31
SCOPO DELLA TESI	33
MATERIALI E METODI	34
1. Ceppi murini utilizzati e disegno sperimentale	34
2. Ceppo probiotico utilizzato e protocollo di somministrazione	35
3. Test orale di tolleranza al glucosio (OGTT)	35
4. Analisi della flora fecale	36
4.1 Estrazione del DNA batterico dalle feci	36
4.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	36
4.3 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	38
4.4 Sequenziamento genico e identificazione dei microrganismi	38
4.5 Analisi quantitativa della flora batterica intestinale mediante qPCR	40
5. Determinazione dei livelli di mRNA mediante PCR quantitativa	41
5.1 Estrazione dell'RNA totale	42
5.2 Retrotrascrizione (RT) e amplificazione dei geni di interesse	43
5.3 Allestimento di curve standard per PCR quantitativa	44
5.3.1 Ligazione del prodotto di PCR nel vettore pGEM [®] -T (TA cloning)	44
5.3.2 Caratteristiche del vettore p-GEM [®] -T	44
5.3.3 Trasformazione in cellule batteriche	45
5.3.4 Verifica del clonaggio	45
5.3.5 Preparazione della curva standard per PCR quantitativa	46
5.4 Determinazione dei livelli di mRNA mediante Real Time PCR	46
6. Quantificazione di citochine tramite Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (E.L.I.S.A.)	47
7. Colture di cellule epiteliali intestinali umane (Caco2)	49
7.1 Determinazione dell'espressione di peptidi antimicrobici in CaCo ₂	

stimolate con hRELM β	49
7.2 Determinazione dell'espressione di RELM β in CaCo2 stimulate con <i>Lactobacillus crispatus</i> M247	50
8 Saggio di Attività Antimicrobica sul surnatante di cellule CaCo2	50
RISULTATI	52
1. Valutazione dell'andamento del peso corporeo	52
2. Valutazione dell'introito calorico giornaliero	53
3. Valutazione del grasso peso del totale e del peso del fegato	54
4. Valutazione della tolleranza al glucosio	55
5. Valutazione istologica della steatosi epatica	57
6. Valutazione dei livelli di TNF-α e IL-6 nel fegato	58
7. Studio della flora intestinale mediante DGGE	59
8. Determinazione quantitativa della flora intestinale mediante qPCR	65
9. Analisi filogenetica della flora intestinale	68
10. Espressione di Resistin like molecole β (RELMβ) nell'ileo	73
11. Espressione dei livelli di peptidi antimicrobici nell'ileo	75
12. Effetto della stimolazione di Relmβ sull'espressione delle defensine in un modello di cellule intestinali umane (CaCo2)	78
13. Saggio di attività antimicrobica su surnatante di CaCo2 stimulate con hRELMβ	80
14. Effetto della supplementazione dietetica con <i>Lactobacillus crispatus</i> M247 sull'andamento del peso corporeo	81
15. Effetto della supplementazione con <i>L.crispatus</i> M247 sull'introito calorico e sul peso del tessuto adiposo totale	82
16. Effetto della supplementazione dietetica di <i>L.crispatus</i> M247 sulla tolleranza al glucosio	84

17. Effetto della supplementazione dietetica con <i>L.crispatus</i> M247 sulla steatosi epatica, sul parenchima adiposo e sulla mucosa ileale.	85
18. Effetto della supplementazione dietetica con <i>Lactobacillus crispatus</i> M247 sulla modificazione della flora intestinale indotta dalla dieta VHF.	87
19. Effetto della supplementazione dietetica di <i>L.crispatus</i> sull'espressione ileale di RELMβ e peptidi antimicrobici	88
20. Effetto del <i>Lactobacillus crispatus</i> M247 sull'espressione di Relmβ indotta da Acido Stearico in un modello di cellule intestinali umane (CaCo2)	90
21. Effetto del <i>Lactobacillus crispatus</i> M247 sull'espressione di peptidi antimicrobici indotta in un modello di cellule intestinali umane (CaCo2)	90
DISCUSSIONE	92
BIBLIOGRAFIA	98
RINGRAZIAMENTI	102

ABSTRACT

Obesity is due to complex interactions between genetic background and environmental factors, such as diet and lifestyle. Experimental studies suggest that gut microbiota of obese subjects differs from lean ones and that changes in gut microbiota (prevalence of phylum *Firmicutes* in obese condition) are associated to body weight gain and fat accumulation. Conventional mice have significantly more body fat than germ-free counterparts, and germ-free mice are protected from diet-induced obesity. New evidences in literature show the important role of Resistin-like molecule β (Relm β) played in microbiota composition and in induction of insulin resistance. Moreover the intestinal bacterial homeostasis is regulated from antimicrobial peptides secreted from Paneth cells. In the gut of α Defensin5 KO mice there is a predominant presence of bacteria from phylum *Firmicutes*.

In order to investigate the relationship among intestinal microbiota changes, innate immunity and pathogenesis of obesity, male C57Bl/6 WT and Tlr2^{-/-} mice were randomly allocated to receive either regular chow food (RCF) or a very high fat diet (VHFD) for 10 weeks (wks). Body weight was recorded weekly, oral glucose tolerance test, steatosis, liver inflammation, antimicrobial peptides and Relm β expression were assessed in ileum of animals sacrificed following 2, 4, 6 and 10 weeks of diet. In addition, faecal samples were collected every two weeks and the faecal flora studied by PCR-DGGE with universal primers. In order to investigate the potential effects of probiotics in balancing of gut microbiota and improve metabolic syndrome, male C57Bl/6 mice 4 weeks old were fed VHFD and daily supplemented with 10⁸ cfu of *Lactobacillus crispatus* M247 for 10 weeks.

Gut microbiota of diet-induced obese mice resulted in an increased presence of phylum *Firmicutes* compared to mice fed a normocaloric diet. These changes in Gram positive microbiota composition were showed after 4 weeks on VHFD and these modifications were stably maintained over the period of VHFD administration. WT and TLR2^{-/-} mice on RCF showed comparable body weight gain whereas TLR2^{-/-} mice on VHFD were more prone to body weight gain than WT mice (32.05 \pm 0.5 g and 27.5 \pm 0.49 g, respectively, at 10 wks, $p < 0.02$). In WT mice on VHFD Relm β mRNA level ($p = 0.02$ vs mice on RCF) is increased whilst expression of intestinal antimicrobial peptides (RegIII β , RegIII γ) mRNAs is downregulated ($p = 0.01$ vs mice on RCF). Indeed, hRELm β caused a significant upregulation of β Defensins and α Defensins ($p = 0.03$ and $p = 0.02$ respectively) in *in vitro* model of intestinal epithelial cells (CaCo2).

Interestingly, we observed limited changes of gut microbiota in mice receiving a VHF and oral supplementation with *L. crispatus* M247 (e.g. the presence of *Firmicutes* is not predominant like mice on VHFD without supplementation of probiotic strain). Indeed, mRNA level of Relm β in ileum was

down-regulated ($p=0,01$ vs mice on VHFD) whilst the expression of intestinal antimicrobial peptides was up-regulated ($p=0,05$ vs mice on VHFD). Strikingly, *L. crispatus* M247 significantly inhibited stearic acid induced Relm β up-regulation in Caco2 cells in vitro. This data is extremely interesting since *L. crispatus* M247 supplementation significantly improved glucose tolerance test (AUC: 591 ± 94 mg/dl² in VHFD mice vs 397 ± 37 mg/dl² in VHFD mice plus *L. crispatus* M247, $p<0.02$) although mice receiving probiotic supplementation did not show significant differences in body weight gain as compared to mice receiving only VHFD.

In summary we suggest that microbiota modifications precede the development of a diet induced obese phenotype and these changes can be triggered by changes in the mucosal production of RELM β , a key factor involved in glucose and gut microbiota homeostasis. Probiotic supplementation, affecting RELM β production might favorably affect gut microbiota and metabolic syndrome severity.

RIASSUNTO

L'obesità è dovuta alla complessa interazione tra componenti genetiche e fattori ambientali, come la dieta e lo stile di vita. Studi sperimentali condotti *in vivo* dimostrano come la composizione della flora intestinale dei soggetti obesi differisca dai soggetti non obesi e come questi cambiamenti siano associati all'aumento di peso. I topi germ-free presentano meno accumulo di grasso rispetto ai topi normali e sono meno predisposti all'obesità non genetica (obesità indotta dalla dieta). Studi recenti hanno messo in evidenza l'importanza del ruolo svolto dalla Resistin-like Molecul β (Relm β) nella composizione della flora intestinale e sull'insulino-resistenza. L'omeostasi batterica, tuttavia, viene regolata dalla produzione a livello intestinale da peptidi antimicrobici secreti dalla cellule del Paneth: le defensine. In topi mancanti del gene che codifica per la α Defensina 6, infatti, si verifica la prevalenza del phylum batterico dei *Firmicutes*.

Allo scopo di chiarire la relazione tra la modificazione della flora intestinale, immunità innata e obesità, topi C57Bl/6 WT e Tlr2^{-/-} (deficienti del gene che codifica per il recettore TLR2 dell'immunità innata) sono stati posti per 10 settimane a dieta normocalorica e iperlipidica (VHF-Very High Fat diet).

Il peso corporeo è stato registrato settimanalmente, mentre il test di tolleranza al glucosio, la steatosi, l'infiammazione, la valutazione dell'espressione di Relm β e dei peptidi antimicrobici nell'ileo degli animali trattati, sono state effettuate a 2, 4, 6, 10 settimane. Contemporaneamente campioni fecali sono stati raccolti ogni due settimane e lo studio sulla composizione della flora batterica è stato condotto tramite PCR-DGGE con primer universali amplificanti la regione 16S ribosomiale batterica. Allo scopo di investigare l'effetto di un microrganismo probiotico sulla composizione della flora intestinale e sulla sindrome metabolica, topi C57Bl/6 di 4 settimane di vita sono stati alimentati con dieta normocalorica e VHF supplementata e non con *Lactobacillus crispatus* M247 per 10 settimane.

I topi WT C57Bl/6 tenuti a dieta VHF presentano una flora intestinale costituita prevalentemente da *Firmicutes* rispetto ai topi WT tenuti a dieta normocalorica. Questi cambiamenti sono stati osservati dopo 4 settimane di dieta grassa e queste modificazioni sono persistite per la restante parte del periodo di somministrazione della dieta. I topi WT e

TLR2^{-/-} tenuti a dieta normocalorica hanno avuto un incremento di peso paragonabile, mentre nel gruppo VHF i i topi TLR2^{-/-} hanno raggiunto un peso maggiore rispetto ai topi WT (32.05±0.5 g and 27.5±0.49 g, a dieci settimane rispettivamente $p<0.02$).

Nei topi WT a dieta VHF i livelli di mRNA di Relm β nell'ileo risultano aumentati rispetto ai topi tenuti a dieta normocalorica ($p=0,02$ vs topi a dieta normocalorica), mentre l'espressione dei peptidi antimicrobici risulta diminuita ($p=0,01$ vs topi a dieta normocalorica). Inoltre, hRELM β causa una significativa down-regulation di β Defensine ed α Defensina ($p=0,03$ and $p=0,02$ rispettivamente) in un modello in vitro di cellule epiteliali intestinali (CaCo2).

Sorprendentemente è stato osservato un limitato cambiamento nella composizione del microbiota in topi che hanno ricevuto una dieta VHF supplementata con *Lactobacillus crispatus* M247. (la presenza di *Firmicutes* non è così predominante come nei topi a dieta VHF senza supplementazione con il probiotico). Inoltre i livelli di mRNA di Relm β nell'ileo risulta down-regolata ($p=0,01$ vs topi VHF), mentre l'espressione di peptidi antimicrobici risulta up-regolata ($p=0,05$ vs topi VHF). Inoltre, *L. crispatus* M247 inibisce l'up-regolazione indotta da Acido Stearico di Relm β nelle cellule Caco2 in vitro. Questi dati sembrano molto interessanti se si pensa che la supplementazione di *L. crispatus* M247 migliora la tolleranza al glucosio (AUC: 591±94 mg/dl² in topi VHF vs 397±37 mg/dl² in topi VHF+*L. crispatus* M247, $p<0.02$), sebbene i topi che hanno ricevuto la supplementazione non mostrano differenza significative nell'aumento di peso rispetto ai topi tenuti a dieta VHF senza supplementazione.

Riassunto si può concludere che: le modificazioni della flora intestinale precede l'aumento di peso nel modello di obesità non genetica utilizzato e che, questi cambiamenti potrebbero essere legati ai cambiamenti di produzione mucosale di RELM β , fattore chiave nell'omeostasi del glucosio e del microbiota intestinale. Inoltre la supplementazione dietetica, attraverso una down-regolazione dell'espressione di RELM β favorisce l'attenuarsi della severità della sindrome metabolica.

INTRODUZIONE

1. Obesità

L'obesità è una condizione morbosa caratterizzata da un eccesso di massa grassa rispetto alla massa magra, in base ai limiti ritenuti normali per età, sesso e statura. In linea generale si parla di obesità quando il peso corporeo supera il peso ideale di almeno il 20% .

L'incidenza dell'obesità negli ultimi decenni è cresciuta drammaticamente. Si stima, infatti, che colpisca circa 300 milioni di persone in tutto il mondo. Si calcola che nei paesi occidentali l'obesità sia diffusa nel 10-15% della popolazione con percentuali anche più elevate se si considerano anche i soggetti in sovrappeso. Anche se ormai l'obesità interessa la maggior parte dei paesi del mondo, è sicuramente ancora oggi un problema di particolare rilevanza negli Stati Uniti. Sono oltre 40 milioni gli americani che possono essere definiti obesi e l'obesità è la prima causa di morte, causando almeno 300 mila decessi l'anno. Secondo i Centers for Disease Control and Prevention (CDC) americani, tra gli adulti statunitensi di età compresa tra i 20 e i 74 anni, la prevalenza del sovrappeso è aumentata del 2% dal 1980, passando dal 33 al 35% della popolazione nel 1999. Nello stesso arco di tempo, invece, l'obesità è quasi raddoppiata, passando dal 15 al 27% della popolazione raggiungendo il 31% circa nel 2000.

Questi dati acquistano ancora più significato qualora si consideri che l'obesità è un fattore di rischio per diverse patologie. Essa predispone all'ipertensione, alle malattie cardiovascolari, al diabete mellito di tipo 2, ai tumori ormono-dipendenti, alla colelitiasi e alla sindrome delle apnee notturne. La combinazione di obesità addominale, di Diabete Mellito di tipo 2, di ipertensione e ipertrigliceridemia costituisce un importante fattore di rischio per l'aterosclerosi, essa infatti si definisce Sindrome Metabolica o Sindrome X , dove l'iperinsulinemia, dovuta alla resistenza all'insulina, risulta essere il fattore comune nonché causale. Curare l'obesità costituisce pertanto un'evidente necessità medica, dal momento che anche una modesta diminuzione del peso può ridurre la morbilità e la mortalità.

1.1 Metodi di misura dell'obesità

L'obesità viene valutata attraverso diversi parametri :

Indice di massa corporea (BMI, body mass index): si calcola dividendo il peso corporeo, espresso in kg, per il quadrato dell'altezza espressa in metri quadrati. Mediante il calcolo del BMI, si definisce

obeso un soggetto avente indice di massa corporea $>30 \text{ kg/m}^2$. Un BMI compreso fra 25 e 29 è invece indice di sovrappeso.

Rapporto tra circonferenza vita e circonferenza fianchi: è un parametro usato per definire il tipo di obesità. Nell'obesità viscerale o androide il tessuto adiposo è prevalentemente distribuito nella zona addominale, mentre nell'obesità ginoide o periferica, la distribuzione dell'adipe interessa maggiormente i fianchi. Il primo tipo è più diffuso nell'uomo e si caratterizza per un'abbondante distribuzione del tessuto adiposo a livello del tronco, della radice degli arti, della nuca e del collo. Il secondo tipo di obesità è più frequente nella donna e si caratterizza per una distribuzione del tessuto adiposo a livello dei fianchi, dei glutei e degli arti inferiori. Questo può essere spiegato dalla differente azione svolta dagli ormoni steroidei nei confronti del tessuto adiposo: il testosterone riduce il numero degli adipociti, mentre gli estrogeni fanno aumentare sia il numero, sia il volume degli adipociti. (Francini-Pesenti et al. 2008).

Il rischio per la salute aumenta in presenza di una distribuzione addominale del tessuto adiposo piuttosto che in una distribuzione periferica. Il rapporto tra valore della circonferenza alla vita e valore della circonferenza ai fianchi dovrebbe essere <0.8 nella donna e <1 nell'uomo. Una circonferenza della vita superiore a 100cm nell'uomo e superiore a 95 cm nella donna comportano un rischio di malattie cardiovascolari correlate all'obesità. (Beltramolli Dario et al, 2008).

1.2 Eziologia dell'obesità

La patogenesi dell'obesità è multifattoriale poiché vi possono concorrere fattori genetici, socioeconomici, comportamentali e ambientali.

Fattori genetici: per il 25-40% l'obesità è di origine genetica ed ereditaria. Recentemente sono state evidenziate due mutazioni genetiche, una di queste riguarda il gene che codifica la sintesi del recettore adrenergico β_3 e si è avanzata l'ipotesi che una ridotta funzionalità di tale recettore possa promuovere l'obesità rallentando la lipolisi e determinando la ritenzione dei lipidi entro le cellule adipose. Per quanto concerne la razza, gli americani di origine africana, i messicani di più bassa estrazione sociale e le popolazioni del Sud Pacifico sono fortemente inclini a sviluppare l'obesità (Bouchard C. et al 1997).

Fattori ambientali e comportamentali: all'insorgenza dell'obesità possono, tuttavia, concorrere fattori ambientali come l'affollamento, l'inurbamento e l'occidentalizzazione della dieta, soprattutto quando questa si arricchisce in grassi che non solo presentano un elevato potere calorico ma inducono un senso di sazietà molto inferiore rispetto, ad esempio, ai carboidrati. Tra i fattori comportamentali un ruolo di primo piano gioca la sedentarietà, cioè la mancanza di un moderato, ma regolare esercizio fisico e l'astinenza dal fumo. Nella sospensione del fumo, le donne tendono ad aumentare di peso più

degli uomini, ma l'aumento ponderale è sempre abbastanza contenuto ed è da ricordare che il rischio di malattia correlato al fumo è molto più grave del rischio che comporta il sovrappeso secondario all'astensione dal fumo. .

Dieta: l'obesità è sempre dovuta ad una discrepanza nel bilancio tra quantità di calorie introdotte e quantità di calorie utilizzate, la regolazione dell'appetito dipende da due centri a livello del Sistema Nervoso Centrale, quello della fame e quello della sazietà. Tuttavia questi non sono gli unici ad agire sulla sensazione della fame, basti pensare ad aspetti di tipo psicologici e sociale che condizionano l'assunzione di cibo, il soggetto obeso ha infatti difficoltà ad adattarsi ad una dieta povera di grassi, l'autocontrollo diventa quindi fondamentale per riuscire a limitare l'introito di cibo.

Disordini endocrini: esistono delle correlazioni ormonali come la Sindrome di Cushing, l'ipotiroidismo o l'ipogonadismo, che si accompagnano ad un aumento ponderale, ma questo, in genere, non risulta superiore a 5-8 kg e può essere evitato riducendo il contenuto calorico della dieta.

Fattori su base iatrogena: diversi farmaci possono concorrere all'aumento ponderale, fra questi i β -bloccanti che riducono la capacità di svolgere attività fisica, i glucocorticoidi, le fenotiazine, molti antidepressivi che aumentano l'assunzione di cibo nonché il desiderio di bere stimolando per lo più l'assunzione di bevande dolci.

1.3 Approcci terapeutici

Il primo passo per la diminuzione del peso corporeo è rappresentato dal mutamento delle abitudini alimentari del soggetto obeso. Una corretta alimentazione prevede una dieta povera di grassi con ridotto introito calorico giornaliero. La dieta dell'obeso deve essere iperproteica (si calcola che essa introduca circa 1,25g di proteine per Kg di peso corporeo) e i due terzi delle proteine introdotte devono essere di origine animale onde assicurare il fabbisogno di aminoacidi essenziali. Deve essere ipoglicidica ed ipolipidica: bisogna evitare l'assunzione di zuccheri semplici prediligendo l'introito di amidi; i lipidi devono essere ricchi di acidi grassi poliinsaturi, più facilmente degradabili e con effetto ipo-colesterolemizzante. È fondamentale un corretto apporto di fibre vegetali come cellulosa e pectine, presenti nei vegetali e nella frutta, poiché inducono un senso di sazietà e riducono l'assorbimento dei grassi e dei carboidrati a livello intestinale. Generalmente nel computo delle calorie, in fase di dimagrimento, si tolgono 1000 kcal a quelle necessarie giornalmente a un soggetto non obeso. Se il soggetto è giovane esso richiede particolare attenzione onde evitare pericolosi squilibri alimentari. Per specifiche indicazioni esistono diete a bassissimo contenuto calorico, suddivise in LCD (Low Calories Diet) che apportano circa 800 kcal/giorno, ed in VLCD (Very Low Calories Diet) che apportano meno di 800 kcal/giorno, in queste diete l'alimentazione è costituita prevalentemente da proteine ed è arricchita in acidi grassi essenziali, vitamine, minerali, mentre pochi

sono i carboidrati. Trattasi di diete per pazienti fortemente obesi (BMI >40) che necessitano di una drastica caduta di peso, richiedono un'attenta supervisione da parte del medico curante e generalmente fanno parte di un più vasto programma di perdita ponderale.

Nelle strategie per ottenere il dimagrimento l'esercizio fisico gioca un ruolo molto importante che tuttavia non deve essere sopravvalutato, è sufficiente un'attività fisica moderata ma costante. L'esercizio infatti non risulta il sistema per dimagrire più incisivo che è e resta la dieta, tuttavia, esso può concorrere alla perdita ponderale.

Accanto alla dieta e all'esercizio fisico, è importante il ruolo svolto dai farmaci. La terapia farmacologica, tuttavia, deve essere intrapresa in connessione con il programma di base sopraelencato poiché, di per sé, essa risulta efficace nel breve ma non nel lungo periodo mentre l'obesità è una malattia cronica ed è noto quanto sia facile riacquistare il peso perduto. I farmaci, qualunque sia il loro meccanismo d'azione, vanno pertanto utilizzati come terapia aggiuntiva a precisi programmi di riduzione ponderale che prevedono modifiche dietetiche e comportamentali, unitamente all'incremento dell'attività fisica. Il trattamento dell'obesità può avvalersi di:

Farmaci Anoressizzanti: sono costituiti da tre classi di farmaci che agiscono centralmente, con meccanismo noradrenergico sul centro della fame, o con meccanismo serotonergico sul centro della sazietà. I primi aumentano la trasmissione adrenergica e quindi l'attività simpatica riducendo l'appetito. I secondi aumentano la liberazione di serotonina negli spazi sinaptici e ne riducono, nel contempo, la ricaptazione neuronale, aumentando il senso di sazietà.

Farmaci Termogenetici: sono agenti dotati di meccanismi d'azione diversi ma tutti capaci di spostare l'equilibrio tra introito e spesa energetica. Si tratta di associazioni di molecole anoressizzanti e termogenetiche, efedrina e caffeina, i cui meccanismi d'azione non sono ancora del tutto chiariti, si ritiene che l'efedrina, per la sua somiglianza strutturale con la noradrenalina, sopprima l'appetito con meccanismo adrenergico, effetto potenziato dalla caffeina. Entrambe le molecole si trovano in commercio in preparati erboristici in dosaggi difficilmente standardizzabili con ben documentato rischio di pericolosi effetti collaterali quali insonnia, vertigini, tremore.

Inibitori dei processi digestivi: a questa categoria appartengono agenti capaci di interferire con l'idrolisi e la digestione dei grassi alimentari nel tratto gastrointestinale determinando una perdita ponderale che può realizzarsi senza effetti sistemici. Tra questi le più conosciute in terapia sono le Statine, inibitori della lipasi gastrica e pancreatica coinvolta nel metabolismo dei trigliceridi che vengono idrolizzati con conseguente liberazione degli acidi grassi e successivo assorbimento di questi nell'intestino tenue. Con questo meccanismo l'assorbimento degli acidi grassi alimentari si riduce di circa il 30%.

2. Flora batterica intestinale

Nel tratto gastrointestinale umano è presente una popolazione microbica dinamica, comprendente dalle 500 alle 1000 specie diverse, detta “microbiota gastrointestinale”. Questo è costituito da una comunità di microrganismi vivi distribuiti nelle nicchie metaboliche del tratto digerente. L'intestino è l'habitat naturale di un elevato numero di microrganismi, considerando che l'intero corpo umano è composto da circa 10^{13} cellule, la flora microbica è 10 volte più numerosa. Il microbiota racchiude sia specie autoctone, acquisite dalla nascita, sia microrganismi transitori di origine ambientale, (Guarner F et al. 2006). L'intestino rappresenta, infatti, uno degli organi a maggior contatto con differenti agenti esogeni (batteri, virus, allergeni), costituendo la prima barriera difensiva nei confronti di microrganismi patogeni che possono aggredire l'organismo.

2.1 Sviluppo della microflora intestinale umana

La colonizzazione del tratto gastrointestinale ha inizio dalla nascita e continua con l'avanzare dell'età fino a formare una microflora peculiare per ciascun individuo. Immediatamente dopo la nascita l'intestino inizia a popolarsi di una serie di microrganismi che variano, sia per effetto di fattori esogeni che endogeni. Durante le prime 12-24 ore di vita extra-uterina a colonizzare sono soprattutto anaerobi facoltativi come *Escherichia coli*, *Enterococchi* e *Streptococchi*. Successivamente, al secondo-terzo giorno, si stabiliscono gli anaerobi obbligati (*Bifidobatteri* e *Lactobacilli*). Nell'arco di dieci giorni la popolazione batterica si espande da 10^8 a 10^{10} /g di feci e si stabiliscono specie come *Bacteroides* e *Clostridi*. Questa successione di colonizzazione potrebbe essere giustificata dalla riduzione del potenziale redox (bassa concentrazione di ossigeno) per effetto degli anaerobi facoltativi che rendono l'ambiente favorevole alla crescita degli anaerobi stretti. Un elemento determinante nello sviluppo di suddetta flora è sicuramente l'alimentazione del neonato: alcuni studi hanno dimostrato come risulti differente la composizione qualitativa della flora batterica di un soggetto allattato al seno rispetto ad uno alimentato artificialmente. Nei neonati allattati al seno, ad esempio, prevalgono *Bifidobacterium* (60-90% della flora fecale) contro un valore inferiore all'1% di batteri lattici, probabilmente ciò è legato alla presenza di fattori di crescita “bifidogenetici” contenuti nel latte materno. Inoltre il latte umano è ricco di monosaccaridi come il lattosio, glicoproteine, glicolipidi, acido sialico, fucosio, N-acetilglucosamina e oligosaccaridi (Gibson and Roberfroid, 1999). Questi ultimi non vengono digeriti ma fungono da scudo nei confronti di batteri patogeni tramite il loro ruolo di ligandi o come substrati per i *Bifidobacteria* nel colon. Allo stesso tempo si verifica una diminuzione del pH e un'inibizione della flora putrefattiva a vantaggio di quella fermentante. In questo modo migliorano le funzioni digestive e di assorbimento, viene stimolato il

sistema immunitario e, unitamente alla produzione di vitamine, viene ridotto il rischio di contrarre allergie (Harmsen H.G et al. 2000). Nei neonati nutriti invece con formule lattee specifiche la flora microbica si presenta mista e complessa, molto simile a quella di un soggetto adulto, ovvero contenente Bifidobatteri, Enterobatteri, Lattobacilli, *Bacteroides*, Clostridi, Enterococchi e Streptococchi. (Matsuki et al. 1999). La composizione riguardante i batteri lattici risulta, al contrario, essere simile tra i due tipi di alimentazione: tra i più frequenti lattobacilli trovati emergono: *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*. Questo probabilmente deriva da un miglioramento nella realizzazione di formule lattee sempre più specifiche e complete. Dopo i primi sei mesi di vita, con l'inizio del periodo di svezzamento, la diversificazione della dieta e l'introduzione di cibi solidi si ha una ulteriore differenziazione dei microrganismi, si arricchisce infatti di specie presenti anche in età adulta , in particolare di *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Al primo anno di vita i livelli di *Escherichia coli* ed Enterococchi oscillano tra 10^6 e 10^8 CFU (Colony Forming Unit)/g di feci, mentre si verifica una diminuzione dei Clostridi e un aumento della flora anaerobica che va via via a diversificarsi. L'iniziale colonizzazione risulta sicuramente importante per definire la flora batterica definitiva in età adulta, infatti, una volta costituitasi, essa rimane stabile ad eccezione di possibili variazioni a seguito di diversi fattori di varia natura come ad esempio un cambiamento delle abitudini alimentari o l'insorgenza di patologie.

2.2 Distribuzione della microflora nel tratto intestinale dell'adulto

Su una superficie di 250 m^2 di intestino sono presenti microrganismi appartenenti a 14 famiglie, 45 generi e 400-500 specie differenti, variamente distribuite lungo l'intero tratto intestinale. In particolare la densità cresce in modo esponenziale dalla porzione superiore a quella inferiore dell'intestino.

Nell'intestino tenue predominano anaerobi facoltativi come Lattobacilli, Streptococchi, *Enterobacteriaceae* e anaerobi stretti come *Bifidobacterium* e *Clostridi* (10^4 - 10^8 CFU/ml). (Dethlefsen L. et al. 2006) .

Nel colon sono localizzati la maggior parte dei batteri, 10^{12} CFU/g di contenuto luminale, l'alta densità registrata è giustificata sia per il transito lento del materiale ingerito sia per il basso potenziale redox presente in questo tratto, questo infatti è l'unico tratto in cui la flora intestinale si stabilizza in maniera permanente. La microflora qui presente svolge una serie di funzioni tra cui quelle metaboliche, trofiche e di difesa. È stata stimata la presenza di circa 500 specie: prevalgono soprattutto anaerobi stretti come *Bacteroides* e *Clostridi* (tra cui *Ruminococcus*, *Butyrovibrio*, *Fusobacterium* ed *Eubacterium*) *Bifidobacterium* e *Peptococcus*, oltre ad anaerobi facoltativi quali *Lactobacillus* , *Enterococcus* ed *Enterobacteriaceae* (Rastall et al. 2004). La maggior parte di essi

appartiene ai generi *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, mentre i lieviti sono presenti in numero piuttosto basso (10^2 - 10^4 CFU/ml).

2.3 Composizione della microflora nel tratto intestinale dell'adulto

Da recenti studi di biologia molecolare basati sul sequenziamento della regione 16S DNA ribosomiale microbica, si è scoperto come la maggior parte dei batteri d'origine fecale appartenga a due delle maggiori stirpi filogenetiche: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Si ritiene che entrambi i phyla (divisioni) derivino da un precursore comune: il *Methanobrevibacter smithii* (Eckburg et al. 2005). Il maggior numero delle scoperte relative alla microflora sono però spesso legate ai soli campioni fecali: ci sono infatti scarsi studi sulla microflora del colon ascendente, tratto in cui differisce da quella fecale; allo stesso modo possediamo poche informazioni riguardanti la microflora aderente alle pareti del colon stesso.

La maggior parte delle comunità microbiche intestinali appartiene al regno dei *Bacteria* e degli *Archea*. Il primo, più numeroso nel tratto intestinale, comprende molte sottoclassi, diversamente distribuite: *Bacteroidetes* (23%) che comprende il genere *Bacteroides*; *Firmicutes* (64%) che comprende Bacilli, Clostridi e Mollicutes; *Proteobacteria* (8%), batteri Gram negativi come ad esempio *Escherichia coli* ed *Helicobacter pylori*; *Actinobacteria* (3%) che comprende specie quali *Bifidobacterium* (Turrone F. et al, 2008).

Tra tutti i microrganismi presenti le specie dominanti in sede intestinale di un individuo adulto, come detto in precedenza, si possono riassumere in due gruppi principali: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*.

BACTEROIDETES: costituiscono circa il 24-25% del microbiota intestinale e sono costituiti da circa 20 generi, di questi la classe *Bacteroidales* è la più studiata, in particolare il genere *Bacteroides* (Wexler, 2007; Pommerville 2009). Si tratta di specie anaerobiche Gram negative, con struttura a bastoncino, non formanti spore e resistenti ai sali biliari, con notevoli capacità adattative. Il *Bacteroidetes thetaiotaomicron* (BT) è il principale componente della normale flora batterica intestinale; ha una grande capacità di digestione dei polisaccaridi in quanto presenta: due proteine di membrana che legano ed importano amido, 226 glicosidasi (contro le 98 dell'uomo), 64 polisaccaridasi (contro 1 dell'uomo). Il BT ha sviluppato la capacità di "aiutare" l'organismo ospite a recuperare ed usare molti carboidrati della dieta, oltre ai glicani del muco (Bachked and Gordon, Science 2005, Hooper, Ann Rev Nutr 2002). In generale i *Bacteroidetes* possiedono un complesso sistema per metabolizzare i carboidrati inutilizzati dall'organismo ospite.

FIRMICUTES: il nome deriva dal latino "firmus" (forte) e "cutis" (pelle), sono infatti caratterizzati da uno strato di peptidoglicano che conferisce loro durezza. Diverse specie producono endospore che possono sopravvivere in condizioni estreme. Sono batteri Gram positivi, comprendenti 250 generi

suddivisi in tre classi: Clostridi, Bacilli e Mollicuti. I Clostridi sono anaerobi obbligati in grado di produrre endospore, se coltivati in ambiente con basso potenziale redox sono estremamente attivi dal punto di vista fermentativo: metabolizzano sostanze organiche (carboidrati e proteine) con produzione di alcoli, acido acetico, acido butirrico, acido succinico e sostanze volatili come anidride carbonica, idrogeno e acido solfidrico. Il *Clostridium perfringens*, il *C. bifermentans* e il *C. ramnosum* sono le specie più comuni isolati nell'uomo. Più dell'8% degli adulti invece sono portatori sani di *Clostridium difficile*, il quale può causare diarrea, febbre, con sviluppo di colite pseudo membranosa in soggetti che assumono antibiotici (Kharpa K.D. 2003). I Bacilli, come i clostridi, sono in grado di produrre endospore ma a differenza di questi sono batteri aerobi facoltativi o obbligati. Caratterizzati da una tipica forma a bastoncino, comprendono due ordini: *Bacillales* (*Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*) e i *Lactobacillales* (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* etc.). I Mollicutes (dal latino "mollis" , ovvero tenero, e "cutis" , cute) sono invece una classe di batteri privi di parete, di ridotte dimensioni, in genere 0.2-0.3 micron. I più noti sono i Micoplasmi (Wolf et al. 2004).

2.4 Funzioni della flora batterica intestinale

Numerose sono le azioni svolte dall'ecosistema intestinale:

Attività metaboliche e nutrizionali: la microflora è in grado di influenzare il bilancio energetico dell'organismo ospite come dimostrato da diversi studi su animali germ-free in cui è richiesto un 30% in più di energia nella normale dieta per mantenere il peso ideale (Hooper et al 2002). I batteri intestinali traggono l'energia necessaria attraverso il metabolismo di zuccheri e proteine (processo noto col termine di fermentazione). La trasformazione di polisaccaridi non digeribili della dieta (cellulosa, emicellulosa, pectine, gomme, amido non digeribile) avviene ad opera di enzimi batterici che trasformano il materiale derivante dagli alimenti in sostanze volatili (anidride carbonica, idrogeno solforato etc.) e acidi grassi a corta catena (SCFA - Short Chain Fatty Acids): tra questi l'acido acetico (viene riassorbito dalla parete intestinale, riversato nel circolo periferico e utilizzato come substrato energetico dai vari tessuti tra cui il tessuto adiposo per la lipogenesi); l'acido butirrico (fonte energetica per le stesse cellule intestinali), l'acido propionico (riassorbito a livello intestinale, viene utilizzato dal fegato come substrato gluconeogenico). La sintesi degli acidi grassi (definita fermentazione saccarolitica) determina un'acidificazione del pH intestinale, ciò rappresenta un'efficiente sistema di difesa contro microrganismi patogeni. La produzione di SCFA , inoltre, consente la crescita delle cellule intestinali epiteliali, favorendone la proliferazione e la differenziazione. (Guarner et al. 2006)

Modulazione del sistema immunitario: la flora batterica intestinale rappresenta uno stimolo per lo sviluppo e la regolazione del sistema immunitario dell'ospite. A questo scopo l'epitelio intestinale è

fornito di un'insieme di recettori definiti TLRs (Toll-like receptors) in grado di riconoscere eventuali patogeni venuti a contatto con la mucosa intestinale. Il segnale intracellulare che viene a scatenarsi provoca la produzione di citochine in grado di coordinare le risposte di cellule infiammatorie e regolare l'attività di cellule immunocompetenti. (Pessi et al. 2000 Perdigon 1986).

Funzione protettiva: azione esplicata attraverso la repressione della flora microbica patogena. Il ruolo di barriera fisica, insieme alla produzione di sostanze antimicrobiche (batteriocine, ammonio, idrogeno perossido), ed alla competizione per i siti recettoriali epiteliali intestinali e per i substrati , determina un'efficace sistema di difesa nei confronti della flora patogena. Si è osservato, infatti, come gli animali germ-free siano maggiormente suscettibili alle infezioni.

2.5 Fattori che influenzano l'ecosistema intestinale

La diversità e la peculiarità che caratterizza il microbiota intestinale può essere compresa analizzando una serie di fattori che nel tempo possono contribuire a modificarla. Un'alterazione a carico della flora batterica viene definita "disbiosi". Squilibri da un punto di vista qualitativo e quantitativo della flora batterica intestinale possono rendere l'organismo più vulnerabile ai batteri patogeni. Nell'intestino convivono specie batteriche diverse, si possono distinguere batteri ad azione nociva (*Staphylococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* etc.) batteri ad azione protettiva (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*), batteri ad azione intermedia, nocivi solo in determinate condizioni (*Enterococcus*, *Streptococcus*, Batteroidi). Diversi sono i fattori che possono influenzare l'ecosistema intestinale. Come già visto, la composizione della flora è largamente influenzata sin dalla nascita, con l'avanzare dell'età il cambiamento del microbiota diventa più evidente a causa di diversi fattori quali il cambiamento della dieta, la comparsa di malattie, eventuali trattamenti antibiotici, modificazioni del sistema immunitario.

Patologie sia intestinali che extraintestinali possono essere responsabili di una variazione della composizione della flora batterica, le proprietà difensive del sistema immunitario gastroenterico (gut associated lymphoid tissue-GALT) possono variare notevolmente in base al tipo di microflora acquisita durante l'infanzia, si è osservato, ad esempio, come nei bambini soggetti ad allergie vi sia una prevalenza di *Bifidobacterium adolescentis* con induzione di produzione di citochine quali TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, mentre nei bambini sani prevale la presenza di *Bifidobacterium bifidum* associata ad una elevata secrezione di IL-10 (Ouwehand AC et al. 2001).

L'alterazione dell'equilibrio intestinale è stato osservato soprattutto in relazione all'assunzione di antibiotici ad ampio spettro. Questi ultimi sono in grado di provocare una riduzione della microflora

sensibile (in particolare di microrganismi anaerobi), un cambiamento qualitativo e quantitativo delle specie microbiche può ridurre la capacità fermentativa e metabolica del microbiota

L'influenza della dieta sulla composizione della flora microbica risulta evidente già dai primi mesi di vita, dove le differenze maggiori si riscontrano soprattutto nella composizione di bifidobatteri. Nel soggetto adulto, una serie di studi ha dimostrato come il regime alimentare possa influire notevolmente sull'ecosistema intestinale. Uno studio di Hayashi et al. (2002), ad esempio, ha evidenziato differenze marcate nel microbiota fecale di soggetti vegetariani rispetto a soggetti onnivori: il microbiota dei soggetti vegetariani esaminati presentava una percentuale di *Bacteroidetes* pari a circa il 6% dell'intero microbiota, contro il 25% dei soggetti sottoposti ad un normale regime alimentare, mentre la specie *Faecalibacterium prausnitzii* non è stata rilevata pur essendo uno dei principali componenti del microbiota. Una dieta iperlipidica induce considerevoli modificazioni nella composizione del microbiota, la percentuale di *Firmicutes* presenti aumenta notevolmente a discapito del phylum *Bacteroidetes* (Gordon et al 2004).

3. Obesità e flora batterica intestinale

I processi fisiologici che regolano il peso corporeo ed il metabolismo, come i segnali di fame e sazietà, l'integrazione centrale di queste informazioni e la risposta gastrointestinale all'introito di cibo sono divenuti argomenti di ricerca negli ultimi decenni (Ogden et al 2007). Sebbene il peso e la composizione corporea siano determinati dalla concomitanza di diversi fattori (carattere genetico, sociale, culturale), una dieta caratterizzata da alimenti ad alto contenuto calorico, specialmente se associata a scarso esercizio fisico , rappresenta uno dei principali fattori predisponenti all'obesità. Accanto a questa evidenza, altri fattori legati alla regolazione del bilancio energetico dell'organismo possono concorrere a predisporre o ad aggravare questa condizione. (Weigle D.S. et al 1994). Tra questi rivestono un ruolo determinante le attività metaboliche della flora intestinale, in quanto esse facilitano l'estrazione di calorie dagli alimenti agevolando l'accumulo di sostanze, quali acidi grassi, nel tessuto adiposo e nello stesso tempo fornendo energia e nutrienti per la stessa crescita microbica. Le differenze individuali nel recupero dell'energia da parte del microbiota intestinale consentono di dare una spiegazione fisiologica dell'obesità in soggetti che non assumono elevate quantità di alimenti, eccezion fatta per alcune patologie come la sindrome di Cushing (condizione di obesità generata da un'elevata "esposizione" a corticosteroidi). Molti studi, infatti, hanno dimostrato che la flora intestinale di ciascun individuo possiede una propria efficienza metabolica (DiBiase 2008). Quest'ultima sarebbe correlata ad una diversa composizione del microbiota stesso. Nel 2004 il gruppo di ricerca di Jeffrey Gordon (Washington University, USA), ha evidenziato una possibile relazione

tra la composizione della flora microbica intestinale e l'obesità, focalizzando l'attenzione sulle proporzioni delle due principali divisioni batteriche componenti il microbiota: i *Firmicutes* e i *Bacteroidetes*. Da questi studi emerge una prevalenza dei primi rispetto ai secondi nel soggetto obeso. Questo fenotipo obeso è incredibilmente trasmissibile in quanto la colonizzazione di topi germ-free con una flora batterica di derivazione obesa determina un aumento del grasso totale pari al 60 % in più rispetto a topi colonizzati con la flora batterica di un topo normopeso. L'aumento di tessuto adiposo, inoltre, si verifica indipendentemente dalla quantità di flora batterica acquisita o dalla diminuzione nel dispendio energetico (Tilg et al.2009).

Per quanto riguarda studi effettuati sull'uomo, Ley et al. (2005) hanno esaminato la flora batterica fecale di 12 volontari obesi sottoposti ad un programma di riduzione del peso corporeo. Prima dell'inizio della dieta ipocalorica, ristretta in grassi e carboidrati, i pazienti hanno mostrato elevati livelli in *Firmicutes*. Al termine dello studio si è verificato un'aumento nel numero di *Bacteroidetes*, dal 3% iniziale al 15 % finale. Non è stato ancora chiarito il motivo per cui questo si verifica, probabilmente la grande varietà di specie presenti in questo phylum contribuisce ad una maggiore efficienza nell'estrazione di energia a livello intestinale. (DiBiase et al, 2008).

I meccanismi ipotizzati attraverso i quali il microbiota intestinale influenzerebbe l'estrazione di calorie dagli alimenti sono diversi:

- la flora batterica è in grado di produrre molte idrolasi di glucosidi che si occupano della digestione di polisaccaridi complessi derivanti dai vegetali, in questo modo i carboidrati complessi sono metabolizzati in monosaccaridi e acidi grassi a corta catena (SCFAs), importante fonte energetica per l'organismo. (Backhed F et al 2005).

- La colonizzazione dei topi germ-free con il fenotipo batterico obeso sopprime l'espressione di un inibitore della Lipoproteina Lipasi circolante (LPL), il Fasting-induced adipose factor (Fiaf). L'aumento dei livelli di LPL porta ad un'aumentato uptake cellulare di acidi grassi dai triacilgliceroli associati alle lipoproteine.

- L'Adenosine Monophosphate (AMP)-activated Protein Kinase (AMPK) è un enzima ereditato dai lieviti in grado di proteggere il topo dall'obesità indotta da alimentazione ricca di zuccheri e grassi, tipica della dieta occidentale. L'enzima, che controlla lo stato energetico cellulare, tramite fosforilazione, si attiva in risposta a condizioni di stress e monitora lo stato energetico cellulare. I topi germ-free rimangono magri nonostante l'alto introito calorico introdotto: gli alti livelli di AMPK fosforilata nel fegato e nel muscolo scheletrico determinano un aumento dell'ossidazione degli acidi grassi nei tessuti periferici, una diminuzione dei livelli di glicogeno e un'aumentata sensibilità all'insulina nel fegato (Backhed F. et al. 2006).

- Obesità e insulino resistenza sono associate ad una condizione di infiammazione sistemica di carattere cronico. Il lipopolisaccaride (LPS) di batteri Gram negativi rappresenterebbe un fattore scatenante l'infiammazione e l'induzione dell'obesità. L'LPS viene continuamente prodotto, a livello intestinale, attraverso la lisi dei batteri e successivamente assorbito e trasportato dall'intestino ai tessuti da un meccanismo lipoproteina dipendente. L'LPS induce la secrezione di citochine pro infiammatorie (IL-1, IL-6, TNF α) quando si lega al complesso CD14/TLR4 sulla superficie delle cellule del sistema immunitario. (Wright SD et al. 1990).

Da quanto riportato emerge come, da un lato, l'obesità sia caratterizzata da un microbiota differente rispetto al normale e che dall'altro lo stesso microbiota assieme al genotipo dell'ospite e al suo stile di vita potrebbe contribuire allo sviluppo di questa disfunzione metabolica. Vi sono però diversi aspetti da chiarire: l'estrazione esigua di calorie extra dal cibo può influire così notevolmente nell'accumulo di peso? Come e perché la composizione del microbiota intestinale cambia in base all'aumento di peso corporeo? Quali condizioni dell'organismo possono indurre un cambiamento nella composizione microbica nell'obeso?

4. Il sistema immunitario innato del tratto gastrointestinale e meccanismi di difesa dell'organismo

Il tratto gastrointestinale è continuamente esposto ad antigeni introdotti con il cibo dal quale l'organismo si difende con meccanismi immunitari e non immunitari. La prima linea di difesa è la barriera mucosale mentre la componente immunitaria è costituita dal GALT che comprende: linfociti T, linfociti B e Fagociti che processano gli antigeni provenienti dal lume intestinale attraverso cellule epiteliali specializzate, le FAE (Follicle Associated Ephemelia). Tuttavia, alcuni patogeni specializzati sono in grado di invadere l'epitelio intestinale sottraendosi alla fagocitosi da parte delle cellule del sistema immunitario.

4.1 Barriera mucosale intestinale e GALT

La barriera mucosale intestinale è costituita da un unico strato di cellule colonnari e da tessuto linfoide organizzato. Le cellule epiteliali intestinali hanno sulla propria superficie apicale dei microvilli ricoperti da glicocalice, uno strato amorfo ricco di zuccheri neutri ed aminati: microvilli e glicocalice costituiscono l'orletto a spazzola. L'anatomia delle cellule epiteliali aiuta a prevenire l'entrata di antigeni, in quanto sono connesse tra loro da giunzioni strette, inoltre, queste cellule, esprimono i recettori MHC-2 per la presentazione dell'antigene alle cellule del sistema immunitario. Le cellule intestinali producono anche sostanze antimicrobiche, defensine e mucine, che aumentano le

difese nei confronti dei patogeni: le mucine sono i principali componenti del muco che riveste la superficie epiteliale del tratto gastrointestinale. I batteri vengono intrappolati nello strato mucoso ed espulsi dall'intestino con i movimenti peristaltici. Altri componenti importanti del muco sono gli enzimi proteolitici che facilitano la digestione dei polipeptidi in peptidi di 8-10 aminoacidi diminuendone l'immunogenicità.

4.1.1 Peptidi antimicrobici endogeni: le cellule del Paneth

Le cellule del Paneth sono cellule presenti nella mucosa dell'intestino tenue, più precisamente nella porzione luminale delle cripte di Lieberkuhn, esse devono il loro nome al fisiologo austriaco Joseph Paneth che per primo le descrisse nel 1888. Inizialmente furono descritte come cellule dotate di attività digestiva e metabolica, (Selzman et al 1961-Taylor et al 1964), successivamente con la scoperta, all'interno di esse, di sostanze quali il lisozima ed il peptide CRP (cryptidin-related peptides) si è avvalorata l'ipotesi che esse potessero coadiuvare l'azione dell'immunità innata attraverso il rilascio di peptidi antimicrobici (Ouellette et al 2001, Bevins et al. 2004, Porter et al 2002).

Le cellule del Paneth producono e riversano nel lume intestinale una serie di peptidi ad azione antimicrobica attivi nei confronti di un ampio spettro di batteri sia Gram positivi che negativi (Ganz et al 1997), tra questi vi sono: Defensine, Angiogenina 4 (Ang-4), Lisozima, Regenerating gene III (Reg-III), Hepatocarcinoma-intestine-pancreas/Pancreatic associated protein (HIP/HAP).

Le Defensine sono una classe di peptidi antimicrobici cationici caratterizzati da un motivo di sei cisteine che da origine a tre ponti disolfuro, sono classificate in α -Defensine e β -Defensine, a seconda della posizione dei tre legami disolfuro intramolecolari. Le α -Defensine nell'uomo sono prodotte, oltre che dalle cellule del Paneth, anche dai neutrofili circolanti (Human Neutrophil Defensins), entrambe le forme presentano una potente azione antimicrobica sia contro i batteri Gram positivi che negativi. Recenti studi hanno mostrato come nell'uomo la α Defensina5 (HD-5) e la α Defensina 6 (HD-6) siano le forme maggiormente espresse nel piccolo intestino, la concentrazione di mRNA di HD-5 nell'ileo è pari a 5×10^5 copie per 10 ng di RNA, mentre i livelli di HD-6 sono circa sei volte più bassi (Wehkamp et al 2006). Diversamente da quelli umani, i neutrofili murini non esprimono α -Defensine, mentre le cellule del Paneth murine secernono 17 differenti α -Defensine, chiamate Criptidine. (Ouellette et al 1994).

Le β -Defensine sono sintetizzate da diverse cellule epiteliali (pelle, tratto respiratorio, intestino e nel tratto gastrointestinale) (Purjia et al 2004). Diversamente dalle α -Defensine, le beta sono assenti nei neutrofili circolanti e, contrariamente a quello che accade nelle prime dove tutte le diverse forme sono attive indistintamente sui batteri Gram positivi e negativi, la β -Defensina1 e la β -Defensina2 sono più

attive contro i batteri Gram negativi, mentre la β -Defensina3 svolge una potente azione contro i batteri Gram positivi (Lehner et al 1993). Questi peptidi mostrano molteplici attività: antimicrobica, antivirale, antineoplastica e immunomodulatoria (entrambe le isoforme presentano azione chemotattica sia per le T cells che per le cellule dendritiche) (Territo et al 1989).

Tra i meccanismi regolatori dell'espressione di questi peptidi vi è la via dei Toll-like receptor (TLR). Numerosi studi hanno evidenziato un legame diretto tra attivazione dei recettori dell'immunità innata e aumentata produzione di questi peptidi a livello intestinale (Brandi et.al 2007, Vaishnava et al.2008).

Uno studio pubblicato su Nature nel 2009 da Salzman e collaboratori, dimostra come ci sia un legame diretto tra espressione di peptidi antimicrobici e modificazione del microbiota intestinale. In questo studio si denota come la mancanza di un gene codificante per l' α -Defensina5, porti alla modificazione della flora intestinale, inducendo la predominanza di specie appartenenti alla famiglia dei *Firmicutes* rispetto ai *Bacteroidetes*.

4.1.2. II GALT

Il GALT comprende cellule regolatorie del sistema immunitario mucosale, come i linfociti che scatenano una risposta rapida, potente e selettiva contro antigeni patogeni e le cellule fagocitarie che giocano un ruolo fondamentale nella presentazione dell'antigene e nella distribuzione dei microrganismi estranei. Questa organizzazione permette di distinguere gli antigeni dannosi da quelli che non lo sono, infatti la tolleranza è un meccanismo necessario perché la forte risposta immunitaria che permette di contrastare i patogeni può portare ad allergie al cibo o a malattie croniche quando è diretta contro proteine endogene o contro la microflora intestinale.

Disperse nelle cellule epiteliali vi sono le FAE (Follicle-associated epithelia) che formano una vasta rete organizzata di tessuto linfoide associato alla mucosa (MALT), queste sono distribuite lungo tutto il tratto gastroenterico, fanno parte del GALT e sono presenti soprattutto nelle aree dove la concentrazione di microrganismi e di materiale estraneo è più alta. Le FAE sono specializzate nel "campionamento" di antigeni e di microrganismi presenti nel lume intestinale. Tra queste rivestono un ruolo importante le cellule M, cellule epiteliali prive di orletto a spazzola, queste possiedono una tasca nella membrana basolaterale che costituisce un sito di legame per una sottopopolazione speciale di linfociti che legandosi rimane nella superficie luminale. La superficie apicale delle cellule M ha delle micro pieghe con dei microdomini di clastrina che mediano l'endocitosi di macromolecole e virus. Inoltre, l'espressione di glicosilazioni uniche, come quelle dell'antigene A di Lewis, può aumentare l'interazione e l'incorporazione dei microbi. La principale funzione delle cellule M è quella di trasportare gli antigeni dal lume intestinale al GALT attraverso le cellule epiteliali. Tuttavia,

sono proprio queste stesse caratteristiche a rendere l'epitelio intestinale maggiormente accessibile agli agenti patogeni.

Il GALT comprende quattro distinti compartimenti linfoidi: le placche del Peyer, che sono follicoli linfonodali dell'ileo distale e del piccolo intestino, la lamina propria, i linfociti intraepiteliali, e i linfonodi mesenterici (MLN). I follicoli linfatici sono aggregati di cellule B immature e di cellule T CD4+ che si legano alle tasche delle cellule M. Questi entrano in contatto solo con gli antigeni che provengono dal lume intestinale attivando la risposta immunitaria intestinale. Quindi le cellule M, con le proprie micro pieghe, catturano gli antigeni che vengono processati dai macrofagi e quindi presentati ai linfociti T CD4+. Questi ultimi secernono citochine quali IL-2, IL-4, e INF- γ che stimolano i linfociti B a diventare cellule che producono IgA. I linfociti B migrano dai follicoli linfatici alla mucosa circostante e rilasciano IgA nel lume intestinale dove la loro funzione più importante è soprattutto quella di legare i patogeni e prevenire il loro attacco alle cellule epiteliali.

La lamina propria (LP) rappresenta lo strato membranoso su cui poggiano le cellule al di sotto del FAE e attorno ai noduli linfatici. La lamina propria contiene un gran numero di cellule B differenziate, probabilmente più di ogni altro organo dell'organismo e contiene anche linfociti T, cellule dendritiche, macrofagi, mast-cellule e leucociti polimorfonucleati. Questo compartimento è molto importante nel prevenire la diffusione del patogeno quando questo riesce, nonostante la presentazione dell'antigene, ad invadere le cellule epiteliali. I linfociti della lamina propria sono linfociti B che secernono IgA in forma dimerica e linfociti T della memoria. I linfociti T della lamina propria sono soprattutto CD4+ e si dividono in due classi di Th, diverse a seconda del tipo di citochine che producono. Sono presenti, anche se in misura minore, linfociti T CD8+ con funzione citotossica. I macrofagi, le cellule dendritiche e le cellule endoteliali processano gli antigeni per presentarli alle cellule T. La differenziazione in cellule che producono citochine dipende dall'interazione specifica con l'antigene e dalle citochine presenti nell'ambiente. I Th1 rispondono quando è presente IL-12 (rilasciata dalle APCs), che attiva le NK e induce i linfociti T a produrre INF- γ , questi aumentano la produzione da parte dei macrofagi di intermedi reattivi dell'ossigeno e dell'acido nitrico che hanno importanti attività antimicrobiche. I linfociti Th2 secernono IL-4, IL-5 e IL-13 per indurre l'attivazione e la differenziazione dei linfociti B e per richiamare gli eosinofili e le mast cellule nei tessuti. Recentemente sono stati individuati i Th3 che rispondono a citochine immunosoppressive e che sembrano essere coinvolti nella tolleranza (Acheson et al. 2004).

4.2 Recettori TLR

Il sistema immunitario innato dei mammiferi presenta la peculiare capacità di riconoscere gli antigeni microbici, innescando la produzione di numerosi fattori solubili (citochine, peptidi antimicrobici) allo scopo di circoscrivere o debellare l'infezione. I recettori del sistema immunitario, implicati in tali processi sono detti Pattern Recognition Receptors" (PRRs). A questi appartengono anche i Toll-Like Receptors (Volan et al 2007), recettori prima identificati nella *Drosophila Melanogaster*, dove rivestono un ruolo antiparassitario essenziale, e poi caratterizzati anche nell'uomo.

Essi sono presenti sulla parete delle cellule epiteliali e sono in grado di distinguere determinanti molecolari specifici, ma conservati nel corso dell'evoluzione, di origine microbica (PAMPs). I TLR riconoscono strutture caratteristiche della cellula batterica, come il lipopolisaccaride (LPS), lipoproteine, peptidoglicano e acidi lipoteicoici (LTAs) che non sono presenti nelle cellule eucariotiche. Successivamente al riconoscimento dei determinanti batterici, i TLR inducono l'attivazione di geni in grado di innescare risposte volte a controllare il processo infettivo. Sono una famiglia di recettori transmembrana caratterizzati da una porzione extracellulare ricca di leucine e da una porzione intracellulare (TIR domain) che è un dominio funzionale presente anche in altre proteine di traduzione di segnali come il recettore per l'IL-1. Nei mammiferi sono presenti almeno undici TLR, ciascuno con diverse funzioni nel riconoscimento immunitario innato. Molti dei ligandi sono stati identificati ma altri risultano ancora sconosciuti.

Il TLR4 è stato il primo recettore ad essere clonato e caratterizzato nei mammiferi. Esso è espresso soprattutto, ma non solamente, dalle cellule del sistema immunitario, compresi macrofagi e cellule dendritiche (Medzhitov et al 2001). Il TLR4 è coinvolto nel riconoscimento e nella trasduzione del segnale innescato dall'LPS. L'LPS è un glicolipide legato alla parete esterna dei batteri Gram-negativi formato da una porzione polisaccaridica idrofilia e da un dominio idrofobico conosciuto come Lipide A, responsabile dell'attività biologica della molecola. L'LPS infatti è un forte attivatore dei macrofagi, ed in elevate quantità è responsabile dello shock endotossico. La stimolazione dei macrofagi con LPS induce la produzione di varie citochine come il TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-10, la proteina infiammatoria macrofagica (MIP) ma anche di sostanze pro infiammatorie come prostanoidei, leucotrieni ed ossido nitrico. Il TLR4 lega l'LPS solo quando questo è complessato ad un glicosilfosfatidilinositolo, il CD14, ed alla proteina legante l'LPS (lipopolysaccharide-binding protein, LBP). La LBP è una proteina di fase acuta prodotta nel fegato e rilasciata in circolo, essa è in grado di legare e catturare l'LPS presente nel sangue anche a concentrazioni molto basse, dell'ordine delle picomoli. Il CD14 è invece ancorato alla superficie cellulare ed è stato identificato come il

primo recettore in grado di legare l'LPS, presentando per questo una forte avidità.(Medzhitov R et al 2001).

Il TLR2 è espresso dalle cellule presentanti l'antigene e dalle cellule epiteliali, è implicato nel riconoscimento di numerosi prodotti batterici derivanti dai batteri Gram-positivi, come il peptidoglicano (PGN), l'acido lipoteichoico (LTA) e diverse lipoproteine (Akira s et al. 2003). Il TLR2, tuttavia, sembra implicato anche nel riconoscimento di componenti della parete di micobatteri o di lieviti e dell'LPS atipico prodotto da *Leptospira interrogans* e *Porphyromonas gingivitis*. Tale svariato spettro di ligandi riconosciuti dal TLR2 è spiegato in parte dalla formazione di dimeri tra il TLR2 ed almeno altri due membri della famiglia dei TLRs: il TLR1 ed il TLR6. Infatti non è stata ancora documentata l'azione del TLR2 sotto forma di monomero. In particolare il dimero TLR1/TLR2 riconosce ligandi come i lipopeptidi batterici, compresa la lipoproteina micobatterica di 19kDa, lipoproteine meningococciche, ma anche strutture sintetiche di lipoproteine. Il dimero TLR6/TLR2 invece riconosce ligandi come le lipoproteine dei micoplasmi (MALP) ed il peptidoglicano batterico. (Jin MS et al 2008).

Dopo aver riconosciuto il segnale e legato i propri ligandi, i dimeri del TLR2 come il TLR4 inducono l'attivazione a cascata di sistemi di segnale che iniziano con il coinvolgimento del dominio intracellulare dei TLRs, chiamato TIR (Toll/interleuchin-1 receptor), proseguono con il reclutamento di specifiche proteine adattatrici quali il MyD88, questi si complessa con il TIRAP (TIR associated proteins, detta anche Mal, MyD88 associated ligand) per legare IRAK (IL-1receptor associated kinase), il quale, a sua volta, recluta TRAF6 (TNF receptor associated factor 6). TRAF6, mediante TAK1 (TNF receptor associated kinase), attiva IKK (IκB kinase) che a cascata fosforila la proteina legante l'NF-κB permettendo il rilascio di IκB e la conseguente traslocazione nucleare di NF-κB (fattore nucleare inizialmente individuato come una proteina che attiva i geni della catena leggera k delle immunoglobuline nei linfociti B). La traslocazione nucleare di NF-κB iniziata dai ligandi dei TLRs induce la trascrizione di molti geni associati con il signaling dei TLRs, inclusi quelli codificanti per la citochine, chemochine e fattori stimolatori dei linfociti T (quali il CD80 ed il CD86) (Wetzler et al 2003).

5. Probiotici

L'O.M.S. definisce i probiotici come “ micorganismi vivi e vitali che ingeriti in definite quantità, esercitano un'azione benefica sullo stato di salute”(Fioramonti et al 2003). Un gran numero di pubblicazioni scientifiche degli ultimi anni riporta che la capacità di alcune specie di microrganismi di agire come agenti benefici per l'organismo è strettamente legata ad alcuni requisiti che devono essere soddisfatti:

- La specie microbica deve essere scelta tra quelle che sono normalmente presenti nel tratto gastrointestinale, ovvero deve essere di origine umana e non patogena.
- Un numero adeguato di cellule batteriche deve essere in grado di sopravvivere durante il transito attraverso lo stomaco ed il piccolo intestino e quindi devono essere resistenti all'acido, alla bile e ai succhi pancreatici.
- Una volta raggiunto l'intestino devono essere in grado di colonizzare ed aderire all'epitelio resistendo ai movimenti peristaltici.
- Non perdere le proprie caratteristiche durante la conservazione
- Essere in grado di produrre sostanze antimicrobiche (batteriocine)
- Essere capace di inibire i patogeni
- Essere stabile geneticamente
- Essere validato clinicamente e gli effetti benefici devono essere documentati

La tollerabilità e la sicurezza dei probiotici attualmente disponibili è eccellente in quanto essi sono per definizione non patogeni. Tuttavia in pazienti immunocompromessi o debilitati sono stati riportati rari casi di infezione locale o sistemiche che hanno avuto esito favorevole con terapie convenzionali. Il rischio, nella somministrazione di microrganismi vivi, è il trasferimento di resistenze microbiche acquisite ad altri organismi. Fino ad oggi questo evento non si è mai verificato in clinica. I dati disponibili sono rassicuranti, ma occorre sottolineare che mancano, per molti probiotici, studi sistematici per valutarne la sicurezza a lungo termine.

I più comuni probiotici utilizzati appartengono al genere dei lattobacilli, dei bifido batteri e degli streptococchi (Fioramonti et al 2003, Ouwehand et al 2002).

5.1 Meccanismi d'azione proposti per i probiotici

I meccanismi attraverso i quali i probiotici esercitano le proprie azioni biologiche non sono completamente noti e sicuramente sono molteplici. Tra questi vi è la produzione di sostanze ad attività antibatterica come le batteriocine, l'acido lattico, il perossido di idrogeno ed alcune proteasi, la competizione a livello dei siti di legame e per le sostanze nutritive con i microrganismi patogeni,

un effetto trofico sulla mucosa intestinale, un azione normalizzante sulla permeabilità intestinale ed infine la stimolazione del sistema immunitario sia intestinale (GALT) che sistemico.

I batteri probiotici sono in grado di produrre sostanze attive nell'inibire la crescita di batteri appartenenti a specie potenzialmente patogene, queste sostanze prendono il nome di batteriocine. Le batteriocine sono sostanze di natura peptidica prodotte dai batteri Gram positivi, preferenzialmente dai batteri lattici (lattobacilli e bifido batteri) appartenenti a specie diverse da quella produttrice.

L'esistenza di una competizione tra i batteri che normalmente colonizzano l'intestino e quelli potenzialmente patogeni rappresenta un secondo meccanismo d'azione. I batteri "buoni" aderiscono all'orletto a spazzola delle cellule epiteliali intestinali prevenendo l'attacco e la penetrazione di batteri dannosi. La competizione avviene anche per quanto riguarda i nutrienti: i batteri che normalmente costituiscono la microflora intestinale mantengono la propria nicchia ecologica consumando tutti i nutrienti che sono forniti dall'ospite. Questa relazione previene l'aumento di disponibilità di nutrienti che potrebbero favorire lo sviluppo di batteri patogeni (Guarner et al 2003).

La flora bifidogena dell'intestino è in grado di metabolizzare un numero considerevole di oligosaccaridi non digeribili (prebiotici). Questi composti sono fibre che raggiungono inalterate il colon resistendo alla digestione enzimatica e sono in grado di stimolare selettivamente la proliferazione o l'attività di determinate specie batteriche, in quanto rappresentano i loro substrati metabolici selettivi. La fermentazione di questi composti (frutto-oligosaccaridi) da parte di bifidobatteri e lattobacilli porta alla formazione di acidi grassi a corta catena (acetato, propionato e butirato) che fungono da substrato energetico elettivo per i colonociti e sostanze volatili e composti organici che fungono da substrato energetico per l'organismo (idrogeno, anidride carbonica, lattato, piruvato e succinato)

I batteri probiotici sono in grado di promuovere le difese immunitarie dell'ospite modulando la risposta all'attacco da parte dei patogeni e riducendo le reazioni di ipersensibilità (Sutas et al 1996,). La somministrazione orale di lattobacilli aumenta la resistenza non specifica dell'ospite e facilita l'esclusione dei microorganismi patogeni dal tratto gastrointestinale (Perdigon et al. 1998).

Alcuni ceppi di lattobacilli si sono dimostrati in grado di stimolare la produzione di citochine da parte dei macrofagi (Perdigon et al.1986) e di attivare la fagocitosi in esperimenti *in vivo* effettuati sui topi (Perdigon et al 1998). La fagocitosi è responsabile della precoce attivazione della risposta immunitaria. I fagociti rilasciano sostanze tossiche (specie reattive dell'ossigeno ed enzimi litici) in varie reazioni infiammatorie. La capacità dei probiotici di modulare la fagocitosi è però diversa nei soggetti sani rispetto ai soggetti allergici: le persone sane reagiscono sviluppando un effetto immunostimolatorio, mentre nei pazienti allergici è stata riscontrata una "down-regulation" della risposta infiammatoria (Pelto et al 1998).

5.2 Indicazioni cliniche dei probiotici in gastroenterologia

Sebbene l'effetto immunomodulante dei probiotici ne estenda l'utilizzazione a diverse patologie sistemiche (come ad esempio le infezioni respiratorie acute ed urogenitali e le patologie di origine allergica) l'uso clinico più immediato e tradizionale riguarda il trattamento di diverse patologie gastrointestinali:

- Prevenzione e trattamento della diarrea da antibiotici
- Prevenzione e trattamento delle infezioni intestinali
- Trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinali
- Trattamento dell'infezione da *Helicobacter pylori*.

La diarrea associata all'uso di antibiotici (antibiotic-associated diarrhea –ADD) rappresenta una complicanza piuttosto frequente che si verifica in una percentuale di pazienti compresa tra il 5 ed il 25% e che dipende dalla classe di antibiotico utilizzato. Durante la terapia antibiotica si assiste ad un cambiamento della flora intestinale con conseguente diminuita digestione di carboidrati non assorbibili e conseguente diarrea osmotica (Bergogne et al 2000). Studi condotti con la contemporanea assunzione di probiotici, in particolare il *Saccaromyces boulardii* ed il *Lactobacillus ramosus* hanno dimostrato una riduzione superiore al 50% dell'incidenza di ADD (Surawicz et al 1989,D'Sousa et al 2002,Cremonini et al 2002).

I probiotici sono stati utilizzati per decenni nella profilassi e terapia delle gastroenteriti dell'infanzia e negli ultimi anni sono stati condotti studi clinici controllati che ne hanno provato l'efficacia (Guarino et al 2001). La somministrazione di *Lactobacillus casei* riduce durata e gravità della gastroenterite acuta e ne diminuisce il rischio di decorso prolungato. Nel caso d'infezione da Rotavirus, il *Lactobacillus casei* riduce significativamente la durata della diarrea ed accelera l'escrezione dell'agente infettivo stimolando la risposta immune locale specifica da Rotavirus appunto (Guarino et al 1995)

Nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (inflammatory bowel disease-IBD), una risposta infiammatoria inappropriata determina un danno cronico alla mucosa intestinale che si traduce in due distinte condizioni cliniche: la malattia di Crohn e la colite ulcerosa (Podolsky et al 2002). In uno studio condotto su venti soggetti affetti da colite ulcerosa ai quali sono stati somministrati una mistura di ceppi probiotici (VSL#3) è stata osservata una modificazione della flora ed in particolare un incremento significativo della concentrazione fecale di *Streptococcus salivarius* , lattobacilli e bifidobatteri. I probiotici sono quindi in grado di modificare la flora batterica intestinale, determinando un'attenuazione dell'infiammazione cronica, vista l'importanza che riveste la composizione della flora di soggetti affetti da queste patologie (Venturi et al 1999). Diversi studi

effettuati su modelli sperimentali di IBD hanno dimostrato che differenti ceppi di *Lactobacillus* sono in grado di attenuare l'infiammazione intestinale e normalizzare l'alterata permeabilità mucosale (Shanahan et al 2004).

L'infezione da *Helicobacter pylori* è la causa principale dell'ulcera peptica e rappresenta un'importante fattore di rischio per lo sviluppo di cancro e linfoma gastrico (Suerbaum et al 2002). È ormai definitivamente stabilito che l'eradicazione dell'infezione è in grado, non solo di determinare una cicatrizzazione dell'ulcera, ma anche di prevenire le recidive, ottenendo in tal modo una cura vera e propria della malattia (Walsh et al 1995). Diversi studi hanno dimostrato che i probiotici (sia lactobacilli che bifidobatteri) inibiscono la crescita del microorganismo *in vitro* e sono in grado di prevenire l'infezione sperimentale nei roditori inibendo l'adesività dell'*H. pylori* alla mucosa gastrica. (Malfertheiner et al 2002)

5.3 Il genere *Lactobacillus*

I Lattobacilli fanno parte della famiglia dei batteri lattici e ricavano quasi tutta la loro energia dalla fermentazione del glucosio e del lattosio ad acido lattico (fermentazione omolattica). Il loro metabolismo genera ATP da fosforilazione non-ossidativa del substrato. Alcuni batteri appartenenti al genere *Lactobacillus* sono in grado di produrre, attraverso il loro metabolismo, piccoli quantitativi di H₂O₂. Per le caratteristiche della loro parete rientrano nella classe dei batteri gram-positivi. Si tratta di batteri anaerobi facoltativi, asporigeni che hanno dimensioni cellulari di 0.7-1.1 µm per 2.0-4.0 µm e che non sono dotati di motilità. Presentano solamente forma bastoncellare, anche se possono assumere una conformazione a spirale o cocco bacillare in determinate circostanze. La classificazione tassonomica di questo genere batterico è : Bacteria, Firmicutes, Bacilli, Lactobacillales, Lactobacilaceae, Lactobacillus. Il ciclo replicativo varia da 25 minuti a 3-4 ore e si sviluppano in maniera ottimale tra i 30 ed i 40°C, i ceppi termofili possono resistere a temperature più alte (fino a 45°C). Sono associati comunemente con il tratto gastrointestinale degli animali e dell'uomo.

5.4 *Lactobacillus crispatus* M247

Il *Lactobacillus crispatus* M247 è stato isolato da campioni fecali di neonati svezzati ed è stato identificato mediante ibridizzazione con primer specifici per la sub unità 23S del ribosoma batterico. Facendo crescere questo ceppo batterico in un terreno selettivo si è subito notato che si formavano degli aggregati, facilmente visibili ad occhio nudo, sul fondo del tubo nel quale erano stati fatti crescere lasciando il terreno di colore limpido. Successivamente, un saggio di ripartizione che prevedeva l'utilizzo di acqua ed esano ha permesso di identificare *L. crispatus* M247 dalla fase acquosa.

Il *L. crispatus* M247 presenta notevole capacità di adesione alla mucosa e di colonizzazione del tratto intestinale.

Questa capacità è stata dimostrata da saggi *in vivo*: i lattobacilli sono stati somministrati per via orale in volontari sani ed in seguito si è proceduto alla conta dei batteri nei campioni fecali, dove il suddetto lattobacillo risultava sempre presente. (Cesena et al 2001). Il fenotipo aggregante del *L. crispatus* M247 risultano essere molto importanti per l'azione antinfiammatoria svolta dal batterio, in esperimenti su topi è stato osservato infatti che la supplementazione del lattobacillo ha determinato un miglioramento della colite sperimentale da DSS con una riduzione della perdita del peso corporeo pari al 75% e una sensibile diminuzione dell'attività mieloperossidasi (indice di infiltrato linfocitario) nella mucosa colica. (Castagliuolo et al. 2005).

Inoltre il *L. crispatus* M247 ha una potente azione immuno-modulante sull'epitelio intestinale regolando l'espressione dei TLR attraverso l'attivazione del PPAR γ . In particolare, *L. crispatus* M247 dopo l'adesione all'epitelio intestinale rilascia piccole quantità di perossido di idrogeno che attivano nelle cellule epiteliali il PPAR γ che a sua volta media una serie di attività anti-infiammatorie (Voltan).

6. Resistin like molecule beta (RELM β)

La Resistin_like Molecule Beta (RELM β) è una proteina appartenente alla famiglia delle Resistine prodotta esclusivamente nel tratto intestinale, a livello delle *goblet cells*. Fisiologicamente viene prodotta in risposta alla colonizzazione batterica dell'intestino, suggerendo quindi una funzione immunomodulatoria (Nair et al 2008; He et al 2003). L'espressione genica della Relm β infatti viene indotta dall'attivazione del sistema immunitario Th2-mediato (Artis et al 2004). Tuttavia studi recenti hanno evidenziato ulteriori funzioni di questa proteina: regolazione dell'omeostasi del glucosio intestinale, induzione di insulino-resistenza, regolazione della composizione del microbiota intestinale.

La RELM β agisce sull'assorbimento del glucosio a livello intestinale regolando direttamente il trasporto di questi attraverso la regolazione dei meccanismi di trasporto nella cellula, aumentando l'espressione del trasportatore per il glucosio GLUT2 (Krimi et al 2009).

Recenti studi hanno evidenziato un'elevata espressione di questa proteina in modelli murini di obesità genetica (topi db/db) e in modelli murini di obesità non genetica (topi trattati con una dieta ipercalorica). In quest'ultimo caso la composizione della dieta sembra essere determinante per un'elevata espressione della proteina in quanto studi *in vitro* hanno evidenziato una stimolazione diretta di acidi grassi saturi sull'espressione di Relm β (Fujio et al 2008). Inoltre è stato osservato

come una dieta iperlipidica in modelli murini di obesità non genetica aumenta la presenza di Relm β nelle feci (Shojima et al 2005).

A livello epatico alti livelli di Relm β inducono insulino-resistenza, la proteina agisce sopprimendo i segnali indotti dalla stimolazione dell'insulina negli epatociti: studi *in vitro* condotti su epatociti stimolati con la proteina hanno mostrato una down-regulation nell'espressione di IRS1 e IRS2 (insulin receptor substrate, IRS), substrati proteici del recettore dell'insulina (IR) attivati in seguito alla fosforilazione del recettore stesso. Inoltre studi condotti su modelli murini Relm β KO hanno mostrato come l'espressione dei livelli di IRS1 e IRS2 risulta essere attenuata. (Kushiyama et al 2005).

Oltre a questi effetti metabolici, è stata osservata una relazione diretta tra composizione del microbiota ed espressione della proteina, in topi Relm β KO infatti, si osserva una prevalente presenza di microrganismi appartenenti alla famiglia dei *Firmicutes* rispetto ai *Bacteroidetes* (Hildebrandt et al. 2009).

Tutte queste evidenze mettono in risalto l'importante ruolo svolto da questa proteina nell'obesità non genetica, poiché se da un lato svolge un'importante ruolo metabolico regolando l'omeostasi del glucosio a livello intestinale, dall'altro sembra avere un ruolo determinante anche sulla composizione della flora intestinale.

SCOPO DELLA TESI

Tra le cause/conseguenze riconducibili all'obesità, vi è la differente composizione della flora batterica intestinale. Questo studio si propone di :

- investigare la possibile relazione tra la modificazione del microbiota intestinale e l'obesità, allo scopo di meglio chiarirne il ruolo (se di concausa o di conseguenza).
- indagare i meccanismi tramite i quali la flora intestinale .viene modificata nell'obesità.
- “manipolare” la composizione della flora intestinale, attraverso la somministrazione di ceppi probiotici, allo scopo di valutarne gli effetti sulla patologia in esame.

MATERIALI E METODI

1. Ceppi murini utilizzati e disegno sperimentale

In questo lavoro sono stati utilizzati due diversi ceppi murini, acquistati da Charles River Laboratories Italy (Calco, Milano) e mantenuti presso lo stabulario del Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana dell'Università di Padova in condizioni di temperatura e umidità controllate nel rispetto delle norme di sperimentazione vigenti.

Topi C57BL/6J, maschi, di 6-8 settimane di vita. Si tratta di un ceppo sviluppato da un ricercatore americano, Clarence Cook Little, incrociando topi provenienti dal Miss Abbie Lathrop's stock.

Topi B6.129-TLR2tm1kir/J, maschi e femmine. Questo ceppo di topi è knockouts per il gene Tlr2. Le sequenze codificanti la porzione C-terminale (dominio extracellulare) e una parte del dominio transmembrana è stata sostituita con una neo-cassetta inserita tramite ricombinazione omologa. La proteina (Tlr2) non è rilevabile mediante Western Blot analisi dei macrofagi peritoneali ottenuti da topi mutanti omozigoti. In questi topi i macrofagi derivanti dal midollo osseo non rispondono alle lipoproteine delle spirochete (*Borrelia burgdorferi*) e non reagiscono alla stimolazione con LPS leptospirale. I macrofagi peritoneali sono totalmente non responsivi, oppure producono piccole quantità di TNF- α quando vengono stimolati con acido lipoteicoico (LTA) o MALP-2 (macrophage-activating lipopeptide 2) derivante da *Mycoplasma pneumoniae*. (95 voltan)

I topi di ciascun ceppo sono stati suddivisi in due gruppi e sottoposti per 10 settimane a due diete differenti: una normocalorica standard (carboidrati 77%, proteine 19%, grassi 4%) e una ad alto contenuto di grassi (carboidrati 21%, proteine 19%, grassi 60%-VHF). Il cibo è stato acquistato da Sniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Germany). Durante il periodo di trattamento gli animali sono stati allevati in condizioni standard, con cicli regolari di luce e buio, nutriti con cibo ed acqua ad libitum. Il cibo è stato pesato ad ogni aggiunta. Il peso corporeo è stato monitorato settimanalmente. Ogni due settimane sono state raccolte le feci, poste in apposito liquido di trasporto (NaCl 3g/l; KCl 0.2g/l; CaCl₂ 0.1g/l; MgCl₂ 0.1g/l; KH₂PO₄ 0.2g/l; Na₂HPO₄ 1.15g/l; Sodio tioglicolato 1 g/l in acqua distillata sterile) e conservate a -80°C per le successive analisi. Lo studio è durato complessivamente 10 settimane, al termine si è registrato il cibo rimasto, gli animali sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale e sono stati raccolti i campioni biologici (ileo, grasso totale e fegato), con misurazione del peso relativo e immediato congelamento in azoto liquido seguito da conservazione a -80°C per la successiva estrazione di mRNA totale. Una parte dei campioni biologici sono stati invece

inclusi in una soluzione al 10% di formalina per la successiva analisi istologica. Campioni di ileo distale sono stati inclusi e conservati a -80°C in una soluzione di OCT per la successiva analisi

2. Ceppo probiotico utilizzato e protocollo di somministrazione

In questo studio è stato utilizzato come ceppo probiotico il *Lactobalillus crispatus* M247 , fornito da A.A.T.-Advanced Analytical Technologies S.r.l. spin-off presso l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza.

Topi C57BL/6J sono stati casualmente suddivisi a ricevere per 10 settimane quattro diversi tipi di trattamento:

- 1.dieta normocalorica standard (SD) senza somministrazione di probiotico
- 2.dieta SD con somministrazione di probiotico
- 3.dieta ad alto contenuto di grassi (VHF, very high fat) senza somministrazione di probiotico
- 4.dieta VHF con somministrazione di probiotico

Nei gruppi di animali assegnati a ricevere il probiotico, i batteri sono stati somministrati per via orale alla dose giornaliera di 10^8 cfu in 100µl. La supplementazione è avvenuta quotidianamente per sei giorni la settimana per l'intera durata del trattamento. Durante il trattamento gli animali hanno avuto libero accesso ad acqua e cibo. Alla conclusione dell'esperimento i topi sono stati sacrificati e sono stati raccolti i campioni biologici.

3. Test orale di tolleranza al glucosio (OGTT)

Il test orale di tolleranza al glucosio (OGTT, Oral Glucose Tolerant Test) permette di determinare i valori di glucosio ematico (glicemia) a intervalli di tempo regolari, dopo somministrazione a digiuno dello zucchero.

Il test viene utilizzato per valutare l'insulino-resistenza.

Il test è stato eseguito a 10 settimane dall'inizio della supplementazione dietetica sui topi con e senza trattamento con il probiotico, agli animali, lasciati a digiuno per 16 ore, è stata somministrata per via orale una soluzione al 20% p/v di glucosio (10µl per grammo di peso corporeo). La glicemia è stata determinata mediante raccolta di un piccolo campione ematico dalla vena caudale di ciascun animale utilizzando un'opportuno dispositivo (One Touch Ultra Easy Bloodglucose System, Lifescan Inc.). La glicemia è stata valutata prima della somministrazione (tempo 0) e dopo 30, 60, 90, 120 minuti dal carico orale di glucosio. La tolleranza al glucosio è stata calcolata tramite la valutazione dell'area sottesa alla curva (AUC) con la seguente formula:

$$AUC = (A+B \times 2 + C \times 2 + D \times 2 + E) / 2 - A \times 4$$

Dove : A è la concentrazione iniziale di glucosio (tempo 0)

- B è la concentrazione di glucosio a 30 minuti
- C è la concentrazione di glucosio a 60 minuti
- D è la concentrazione di glucosio a 90 minuti
- E è la concentrazione di glucosio a 120 minuti

4. Analisi della flora fecale

4.1 Estrazione del DNA batterico dalle feci

I campioni sono stati omogenati nel proprio liquido di trasporto e centrifugati a 10000 rpm per 10 minuti, il pellet ottenuto è stato risospeso in acqua sterile e centrifugato nuovamente, l'operazione è stata ripetuta due volte. Successivamente il pellet è stato risospeso con 1ml di Buffer per Lisozima (100mM di TRIS-HCl a pH 8, 10Mm di EDTA e dal 25% v/v di una soluzione concentrata di saccarosio) , al quale , previo riscaldamento a 37°C in bagnetto termostato, viene aggiunto il Lisozima (5mg/ml). I campioni, dopo digestione enzimatica a 37°C per 2 ore, sono stati centrifugati a 10000 rpm per 10 minuti, il pellet è stato risospeso in EDTA 0,5 M ed addizionato di SDS all'1%, e Proteinasi K allo scopo di degradare le membrane batteriche a consentire la fuoriuscita del DNA da una parte e inattivare e degradare le proteine contaminanti dall'altra. I campioni sono stati posti in termoblock alla temperatura di 55°C per 2 ore e , dopo raffreddamento in ghiaccio per 15 minuti, è stata aggiunta RNase A . Dopo 2 ore di digestione in bagnetto a 37 °C per consentire la degradazione dell'RNA, è stata aggiunta una soluzione di Potassio Acetato allo scopo di far precipitare le proteine presenti. I campioni così pretrattati, sono stati sottoposti ad estrazione con cloroformio: è stata aggiunta una miscela Cloroformio-Acido Isoamilico in rapporto 24:1 e dopo lenta agitazione i campioni sono stati centrifugati a 10000 rpm per 10 minuti. Il trattamento ha prodotto due fasi: la fase acquosa superiore contenente il DNA, l'interfaccia contenente le proteine insolubili ed i prodotti di degradazione e la fase inferiore contenente proteine solubili e lipidi. La fase superiore è stata trasferita in una nuova eppendorf, supplementata con Isopropanolo e lasciata a temperatura ambiente. Dopo 2 ore i campioni sono stati centrifugati per 30 minuti a 10000 rpm, il surnatante è stato eliminato ed il pellet contenente il DNA è stato asciugato a temperatura ambiente e successivamente risospeso in acqua sterile e conservato a -20°C.

4.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica che consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte di acido nucleico (Karp 2004,

sus) . Prerequisito fondamentale perché avvenga la replicazione è la conoscenza delle sequenze alle estremità della regione bersaglio. Nella reazione, infatti, sono coinvolti due oligonucleotidi a singolo filamento (i primers) complementari uno al 3', l'altra all'estremità 5' del segmento di DNA che si vuole amplificare e che servono da innesco per la DNA polimerasi. Questo enzima, la Taq DNA polimerasi, isolato per la prima volta nel 1988 da un batterio termoresistente (il *Thermus aquaticus*), è in grado di resistere alle elevate temperature a cui si sottopone il DNA per la denaturazione della doppia elica. Oltre alla Taq Polimerasi ed ai primers di interesse, è fondamentale la presenza di MgCl₂ , cofattore indispensabile all'attività svolta dalla DNA polimerasi.

La reazione segue diversi cicli :

Denaturazione : la doppia elica del DNA stampo si scinde in due filamenti (T = 95°C)

Appaiamento: i primer si appaiono alle sequenze nucleotidiche a singolo filamento ad essi complementari (T = 50°-70° C)

Estensione: a partire dai primer la Taq sintetizza la nuova elica complementare al DNA stampo in direzione 5'-3' (T = 68°-70° C).

Nello studio sono state utilizzate tre diverse coppie di primer universali amplificanti la regione 16S Ribosomiale batterica:

1) Primer universali HDA1-GC e HDA2 (Tannok et al 2000):

HDA1-GC : 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGTGGCGGGGCGGGGCGCGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'
HDA 2: 5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'

Prodotto di amplificazione: 200 pb

Ciclo di amplificazione : 94°C per 3 minuti, 30 cicli di amplificazione composti da 94°C per 30 secondi, 56°C per 30 secondi, 68°C per 60 secondi e la fase finale di estensione a 68°C per 7 minuti.

2) Primer universali L1401 e U968-GC (Ulrich et al 1996):

U968-GC: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGCGCGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3'
L1401: 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'

Prodotto di amplificazione: 450pb

Ciclo di amplificazione : 94°C per 5 minuti, 35 cicli di amplificazione composti da 94°C per 1 minuto, 63°C per 1 minuto, 72°C per 1 minuto e la fase finale di estensione a 72°C per 5 minuti.

3) Primer universali P2-P3 (Muyzer et al 1993):

P2: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
P3 : 5'-CGCCCGCCGCGCGGGGCGGGGCGGGGCGCGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Prodotto di amplificazione : 190pb

Ciclo di amplificazione : i campioni vengono prima denaturati a 94°C per 5 minuti, segue 1 minuto a 65°C, quest'ultima viene diminuita di un grado ogni secondo ciclo di amplificazione fino alla temperatura di 55°C, a questa temperatura seguono poi altri cinque cicli. Questa procedura, definita touchdown , consente di eludere la formazione di prodotti aspecifici. L'estensione finale dei prodotti di reazione avviene alla temperatura di 72°C per 3 minuti.

La miscela di reazione è comune alle tre coppie di primers e prevede un volume finale di 50µl formato da : Buffer di reazione (10mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl, 50 mM KCl, Applied Biosystem), deossinucleotidi trifosfato ognuno alla concentrazione 200mM, 20 pmol di ogni primer, 2,5 U di Taq DNA polymerase.(Applied Biosystem) e 10 ng di DNA fecale.

4.3 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

L'elettroforesi su gradiente di gel denaturante (DGGE) è una tecnica di fingerprinting genetico che consente di separare i frammenti di DNA, amplificati mediante PCR, in base alle loro differenti proprietà di dissociazione o "melting". Il DNA amplificato viene frazionato attraverso una corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide con gradiente di sostanze denaturanti (formamide e urea), i frammenti amplificati di DNA riducono la loro velocità di migrazione quando raggiungono una concentrazione di denaturante del gel che corrisponde alla loro temperatura di fusione (T_m, temperatura di melting) , questa è strettamente dipendente dalla composizione nucleotidica del DNA , in questo modo i diversi frammenti si dissocieranno in punti diversi del gradiente denaturante e saranno distinguibili in base alla diversa migrazione elettroforetica.

L'analisi DGGE è stata effettuata utilizzando Ingeny 2X2 System (IngenyPhor, Denmark) a 60°C e 120V per 16 ore. Il gel era costituito dall'8% di Poliacrilamide in gradiente di Urea (30%-60%). Sono stati caricati 40µl di amplificato in buffer TAE 1X infine il gel è stato marcato con SybrGreen dye (Biorad, USA) e visualizzato mediante transilluminatore a raggi UV. Le bande d'interesse sono state escisse dal gel ed il DNA eluito in acqua distillata sterile per 18 ore d'incubazione a 4°C. Una frazione del DNA (10 ng) è stata sottoposta a reazione di PCR con i primers corrispondenti (L-U, HDA1-HDA2, P2-P3) precedentemente descritti. Gli ampliconi sono stati purificati mediante colonne Microcon Centrifugal Filters (Millipore).

4.4 Sequenziamento genico e identificazione dei microrganismi

I prodotti di PCR purificati sono stati sottoposti a reazione di sequenziamento per l'identificazione del genoma batterico. È stato utilizzato un sequenziatore automatico a 16 capillari (ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems).Nella reazione di sequenziamento vengono utilizzati dideossinucleotidi terminatori (ddNTP) cui è legato un gruppo donatore di fluorescenza

(fluoresceina) collegato, tramite un *linker*, ad un gruppo accettore di fluorescenza. Il *linker* assicura la massima efficienza di trasferimento di energia tra il gruppo donatore ed accettore di fluorescenza. Questi due gruppi sono associati ai ddNTP in modo tale da non interferire stericamente con la reazione di incorporazione del filamento di DNA neosintetizzato. Ognuno dei quattro ddNTPs lega un diverso gruppo accettore, che è eccitato dalla stessa lunghezza d'onda (448 nm) ma emette il massimo di fluorescenza in un diverso intervallo di lunghezza d'onda, variabile tra 500 e 700 nm (dR110 per la guanosina nel blu, dR6G per l'adenosina nel verde, dTAMRA per la timidina nel giallo, dROX per la citidina nel rosso).

Il DNA da sequenziare è stato amplificato mediante una reazione di PCR, condotta in un volume di 16 µl contenente 500 ng di DNA, 3,2 pmoli di primer specifico (HDA2, L1401, P2), 1 µL DI Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (contenente i 4 ddNTP terminatori marcati con i quattro fluorocromi e la polimerasi), 2 µl di buffer specifico 5x (5mM MgCl₂, 200 mM Tris-HCl pH 9), il tutto portato a volume con acqua sterile. L'enzima che catalizza la reazione è l'AmpliTaq polimerasi che, a differenza della Taq polimerasi, è priva dell'attività nucleasica e discrimina con minor efficienza dNTP e ddNTP. La reazione di PCR di sequenza è stata condotta secondo il seguente schema ripetuto per 35 cicli: denaturazione a 96°C per dieci secondi, appaiamento a 50°C per 5 secondi, allungamento a 60°C per 4 minuti. Il DNA a singolo filamento così ottenuto, viene purificato mediante precipitazione a freddo con Sodio Acetato 3M e successivi lavaggi con Etanolo 95% ed al 70%. Tale purificazione permette di eliminare i terminatori di catena in eccesso che potrebbero interferire nell'analisi della sequenza. Una volta liofilizzato, il DNA viene risospeso in 10 µl di Formamide (Amresco[®]) e denaturato a 95°C per 2 minuti. Il DNA così ottenuto viene quindi analizzato al sequenziatore automatico: il DNA lineare a singolo filamento viene separato per elettroforesi capillare ed illuminato con una luce a lunghezza d'onda di 448 nm. Le differenti lunghezze d'onda di emissione associate ai quattro ddNTPs vengono rilevate e registrate dal software Sequencing Analysis. Analizzando quindi lo spettro di emissione di ciascun campione è possibile ricostruire la sequenza nucleotidica del DNA.

Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando il software *Chromas*, versione 1.45 (Conor McCarty, School of Health Sciences Griffith University, Southport, Australia). Il programma consente di ricavare per ogni banda un cromatogramma in cui è riportata la sequenza in esame. La determinazione della sequenza genica è resa possibile utilizzando una banca dati dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information), tramite l'utilizzo del programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) che si avvale di una serie di algoritmi che permettono di confrontare la sequenza di interesse con un data base di sequenze note.

Le sequenze ottenute sono state sottoposte ad analisi filogenetica: sono state considerate solo le sequenze presentanti il 100% di omologia con le specie microbiche presenti nella banca dati consultata. L' allineamento delle sequenze è stato effettuato mediante il programma Clustal W del software MEGA 3.1, l'analisi delle distanze è stata effettuata mediante il metodo Neighbor-Joining (Fritsche et al 2000)

4.5 Analisi quantitativa della flora batterica intestinale mediante qPCR

Per l'analisi quantitativa del DNA fecale sono state utilizzate sette coppie di primers amplificanti la regione 16S ribosomiale dei principali gruppi microbici presenti a livello intestinale: *Eubacterium rectal/Clostridium coccoides* (Erec); *Clostridium leptum* (Clept), *Lactobacillus* sp (Lact), *Bacteroides* sp. (Bact), Mouse Intestinal Bacteria (MIB), Segmented Filamentous Bacteria (SFB) (Salzman et al 2010). Le sequenze nucleotidiche dei primer sono riportate in Tabella 1.

La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando come sistema rilevatore il SYBR[®] Green I dye , un'intercalante del DNA che presenta una minima fluorescenza nella miscela iniziale ed emette fluorescenza a 520 nm solo quando è legato a dsDNA. L'intensità di fluorescenza dipende quindi dalla quantità iniziale del campione. L'emissione di fluorescenza durante l'amplificazione di PCR viene analizzata da un software (SDS, Sequenze Detection System software), che costruisce una curva di amplificazione. Le misurazioni dal 3° al 15° ciclo vengono considerate rumore di fondo (livello di base) e su questi viene calcolata la deviazione standard. I valori di ciclo soglia vengono calcolati determinando il punto in cui la fluorescenza supera di 10 volte la deviazione standard del livello di base. Per determinare la concentrazione iniziale del campione, il software calcola il ciclo soglia di ogni campione e inserisce questo valore in una curva standard con concentrazioni note di uno standard appunto. Il SYBR[®] Green è tuttavia un'intercalante estremamente aspecifico in quanto si lega a qualsiasi molecola di DNA a doppio filamento generato dalla Taq polimerasi. Al termine di ogni reazione di PCR quantitativa quindi è stata effettuata l'analisi delle curve di melting, al fine di escludere la presenza di dimeri di primers o amplificati aspecifici.

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µl in una miscela costituita da 12,5 µl di 2x *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,2 µM primers senso e antisense, 10 ng di DNA ed acqua sterile. Il ciclo di amplificazione è stato costituito da : una fase di denaturazione a 95°C per 3 minuti, seguita da 40 cicli composti da una fase di denaturazione per 10 secondi a 95°C ed una di appaiamento a 60°C per 45 secondi. Primer e condizioni delle reazioni di PCR sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1: Primer utilizzati per la qPCR fecale

Gruppo microbico	Referenza ceppo	Ta (°C)	Sequenze oligonucleotidiche	Amplicone
Eubacteria (Eubact)	<i>Ruminococcus productus</i> (ATTC27340D)	60	5' -ACTCTACGGGGAGGCAGCAGT-3' 5' -ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'	172pb
Bacteroides (Bact)	<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285D)	60	5' -GGTTCTGAGAGGAGGTCCCC-3' 5' -CTGCCTCCCCTAGGAGT-3'	65 pb
Mouse Intestinal Bacteria (MIB)	Plasmid DNA (CT11-6)	60	5' -CCAGCAGCCGCGTAATA-3' 5' -CGCATTCGCATACTTCTC-3'	162 pb
Lactobacillus/Enterococcus (Lact)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4357D)	60	5' -AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' 5' -CACCGCTACACATGGAG-3'	341 pb
E. rectale/C.coccoides (Erec)	<i>Ruminococcus productus</i> (ATTC27340D)	60	5' -ACTCCTACGGGAGGCAGC-3' 5' -GCTTCTTAGTCAGGTACCGTCAT-3'	139 pb
C. leptum (Clept)	Plasmid DNA (Mmp7+/+-3)	60	5' -GTTGACAAAACGGAGAGAAGG-3' 5' -GACGGGCGGTGTGTACAA-3'	244 pb
Segmented Filamentous Bacteria (SFB)	Plasmid DNA (CT25-6)	60	5' -GACGCTGAGGCATGAGAGCAT-3' 5' -GACGGCACGGATTGTTATTCA-3'	109 pb

5. Determinazione dei livelli di mRNA mediante PCR quantitativa

5.1 Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione di RNA totale dalle cellule in coltura è stata effettuata utilizzando il kit a colonnine SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI), seguendo il protocollo indicato. I campioni (<30mg di tessuto o 10^6 di cellule) sono stati omogeneizzati in 175µl di Lysis Buffer (4M di guanidina isotiocianato, 0,01 M di Tris ph 7.5, 0,97 % v/v β mercaptoetanol) utilizzando l'omogeneizzatore Mixer Mill MM300 (Quiagen) per 5 minuti a 30 Hz. Dopo centrifugazione a 13000 xg per 10 minuti, è stato raccolto il surnatante e addizionato di 350 µl

di *SV RNA Dilution Buffer*. I campioni vengono quindi incubati a 70°C per 3 minuti, centrifugati a 13000 xg per 11 minuti a temperatura ambiente ed il surnatante viene trasferito in nuove provette. Dopo l'aggiunta di 200 µl di etanolo al 95%, il tutto è trasferito in colonnine munite di membrana per fissare gli acidi nucleici e centrifugato a 13000 g per 2 minuti, in modo tale che l'RNA precipiti fissandosi così al filtro. Dopo l'aggiunta di 600 µl di *SV RNA Wash Solution*, si procede a una centrifugazione a 13000 xg per 2 minuti. Si prepara quindi la seguente miscela con la *DNase I*:

- 40 µl di *Yellow Core Buffer*;
- 5 µl 0,09 M di *MnCl₂*;
- 5 µl di *DNase I*.

50 µl di tale miscela vengono introdotti in ciascuna colonnina e lasciati incubare per circa 15 minuti a temperatura ambiente; in questo passaggio la *DNase I* esplica la propria azione digestiva sul DNA contaminante. Sono quindi stati aggiunti 200 µl di *SV DNase Stop Solution*, fatta una centrifugazione a 13000 g per 2 minuti ed effettuati infine due lavaggi con *SV RNA Wash Solution*, seguiti ogni volta da centrifugazione per 2 minuti a 13000 xg. Le colonnine sono state inserite nei tubi di eluizione e sono stati aggiunti 100 µl di *nuclease-free water* su ogni membrana. Sono stati centrifugati a 13000 xg per 2 minuti, in modo da eluire l'RNA.

La quantità dell' RNA estratto è stata determinata tramite lettura spettrofotometrica (NanoDrop[®] ND-1000) alla lunghezza d'onda di 260 nm, mentre la purezza è stata stimata tramite i rapporti d'assorbanza A_{260} / A_{280} e A_{260} / A_{230} . L'RNA estratto è stato conservato a -80°C.

5.2 Retrotrascrizione (RT) e amplificazione dei geni di interesse

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA impiegando la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina (MuLV) e utilizzando primers universali (random). Tutte le procedure sono state eseguite in cappa a flusso laminare al fine di evitare contaminazioni. Per la retrotrascrizione (RT) si prepara una miscela costituita da 10 mM di Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 5,5 mM di MgCl₂, 2 mM di d NTPs, 2,5 µM di oligonucleotidi innesco universali (Random hexamers) , 60 U di inibitore dell'RNasi , 1,25 U di trascrittasi inversa MuLV , 2 µg di RNA estratto ed acqua sterile fino ad un volume finale di 50 µl. La miscela viene quindi posta in termociclatore (Mastercycler[®] Personal Eppendorf[®]) per 10 minuti a 25°C seguiti da 60 minuti a 48°C e 5 minuti a 95°C.

Successivamente, 5 µl dei cDNA così ottenuti sono stati amplificati utilizzando primer per valutare la presenza dell'mRNA dei geni di interesse utilizzando oligonucleotidi di sintesi disegnati in base alla sequenza genica codificante la proteina d'interesse ricavata dall'analisi della GenBank. La reazione di amplificazione è stata condotta in 25 µl di una miscela costituita da 10 mM di Tris-HCl pH Mm di KCl, 5,5 Mm di MgCl₂ , 0,4 mM di dNTPs, 0,2 µM di primers senso e antisenso, 0,625 U di Taq

polimerasi (Applied Biosystems) ed acqua sterile. La reazione è stata fatta avvenire in un termociclatore con 40 cicli di amplificazione. Ogni ciclo prevedeva 15 secondi di denaturazione del cDNA a 95°C ed 1 minuto di appaiamento/ estensione alla temperatura indicata. La sequenza dei primers, le temperature di appaiamento e le dimensioni degli amplificati sono riportate in tabella 2 per i geni murini ed in Tabella 3 per i geni umani del paragrafo 5.4. Gli amplificati così ottenuti sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (p/v) (Seakem, FCM), addizionato di etidio bromuro (0,5 µg /ml) e visualizzati mediante transilluminatore a raggi UV.

5.3 Allestimento di curve standard per PCR quantitativa

5.3.1 Ligazione del prodotto di PCR nel vettore pGEM[®]-T (TA cloning)

Ciascuna curva standard utilizzata nella reazione di PCR quantitativa è stata preparata mediante clonaggio del rispettivo cDNA . In un primo momento sono state allestite normali reazioni di PCR utilizzando primers riportati nelle tabelle 1 e 2 e cDNA murino e umano come stampo. I prodotti di PCR sono stati quindi visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% p/v e colorazione con bromuro di etidio, al fine di evidenziare un amplificato delle dimensioni attese. Il prodotto di amplificazione è stato quindi inserito nel vettore di clonaggio pGEM-T (Promega) mediante reazione di ligazione condotta in una miscela formata da 3 Weiss unit di DNA ligasi del fago T4, 5µl di buffer di ligazione 2x (60mM TRIS-HCl pH 7,8, 20mM di MgCl₂, 2 mM ATP, 20 mM DTT), dal vettore (50 ng), dall'amplificato ed acqua fino a volume finale di 10 µl. La miscela, incubata a 16 °C per 18 ore, è stata poi utilizzata per trasformare cellule di *Escherichia coli* DH5α F' precedentemente rese competenti.

5.3.2 Caratteristiche del vettore p-GEM[®]-T

Il vettore p-GEM-T [Figura 5.1] viene fornito nel kit “TA Cloning” (Promega) in forma linearizzata. Il plasmide lineare presenta, alle due estremità 3', delle code di dTTP a singolo filamento. I prodotti di PCR presentano, invece, alle estremità 3', dei prolungamenti costituiti da dATP. La complementarità delle basi permette la ligazione dei due frammenti di DNA, reazione catalizzata da dalla DNA ligasi del fago T4. Il plasmide contiene anche il promotore lac, che controlla l'espressione batterica del gene lacZα codificante per i primi 146 aminoacidi della β-galattosidasi. La ligazione di un frammento di DNA, quale un prodotto di PCR, amplificato mediante Taq polimerasi, interrompe la continuità del gene lacZα, in questo modo il gene codificante la β-galattosidasi non viene più espresso da cellule batteriche di *Escherichia coli* DH5α. La carenza di tale enzima da origine a colonie batteriche di colore bianco anziché blu in un terreno di crescita arricchito con X-gal

(5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside; 40 μ l ad una concentrazione di 40mg/ml). Nella sequenza del plasmide p-GEM[®]-T è compreso anche il gene per conferire la resistenza all'ampicillina, l'origine di replicazione batterica ColE1, la sequenza di basi complementari ai primer M13 Forward ed M13 Reverse.

5.3.3 Trasformazione in cellule batteriche

Per la trasformazione è stato usato il ceppo batterico *E.coli* DH5 α F' (F'/endA1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) gln44 thi-1 recA1 gyrA (NaI^r) re1A1 Δ (lac1ZYA-argF) U169 deoR (Φ 80dlac Δ (lacZ) M15)) (Biolabs). I batteri sono stati coltivati in terreno LB (Luria Bertani) sia liquido (1% bactotriptone, 0,5% estratto di lievito, 1% NaCl) che solido (contenente 1,5% di bacto agar) a cui è stata aggiunta ampicillina alla concentrazione finale di 100 μ g/ml. Tale ceppo batterico è stato dapprima reso competente sottoponendo la coltura batterica in fase di crescita esponenziale precoce (O.D.₆₀₀ =0,375) ad una serie di lavaggi con una soluzione di CaCl₂ 60mM, glicerolo 15% v/v, PIPES 10mM, ph 7.0 e successive centrifugazioni. Infine le cellule, risospese nella stessa soluzione, sono state suddivise in aliquote e conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

La trasformazione delle cellule batteriche è stata ottenuta con il metodo dello shock termico. L'intero volume di legazione (10 μ l) è stato aggiunto a 100 μ l di cellule competenti ed incubato in ghiaccio per 30 minuti. La miscela è stata immersa in bagnetto termostato a 37°C per due minuti ed immediatamente dopo raffreddata in ghiaccio per 5 minuti. Alle cellule è stato aggiunto 1 ml di terreno LB liquido e quindi sono state incubate per 1 h a 37°C sotto lenta agitazione (70rpm). La cellule sono quindi state seminate su piastra LB-agar addizionate di ampicillina e substrato X-gal e lasciate crescere per 16 ore a 37°C. Le colonie di colore bianco (dove la continuità della β -galattosidasi è stata interrotta) sono state sottoposte a screening per ricercare la presenza del plasmide ricombinante contenente l'inserto d'interesse.

5.3.4 Verifica del clonaggio

La verifica del clonaggio del cDNA d'interesse nel plasmide p-GEM[®]-T è stata eseguita mediante estrazione del DNA plasmidico da una coltura batterica di 2ml di terreno. Dopo lisi alcalina dei batteri , il DNA plasmidico è stato purificato mediante estrazione di fenolo/cloroformio e quindi precipitato per aggiunta di isopropanolo . Il pellet , lavato con etanolo al 70%, è stato risospeso in tampone TE pH 8 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) contenente RNAsi pancreatica alla concentrazione di 20 μ g/ml. L'avvenuta inserzione del cDNA d'interesse è stata verificata mediante doppia restrizione enzimatica condotta a 37°C per due ore e successiva corsa elettroforetica su gel di

agarosio per visualizzare i frammenti di DNA delle dimensioni attese. I cloni che mostravano inserti di dimensioni compatibili sono stati, infine, sottoposti a sequenziamento genico (par 4.4) .

Il clone così selezionato è stato fatto crescere in 100ml di LB liquido addizionato di ampicillina. Da tale coltura batterica è stato successivamente purificato il DNA plasmidico tramite plas/midi Isolation Spin-Kit (AppliChem GmbH) secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

5.3.5 Preparazione della curva standard per PCR quantitativa

Dopo aver determinato mediante misura spettrofotometrica la concentrazione di DNA plasmidico, espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, è stato calcolato il corrispondente numero di copie plasmidiche grazie ad un programma di foglio elettronico (MS-Excel) opportunamente impostato. Le concentrazioni espresse in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sono state computate in copie plasmidiche / μl . Il plasmide purificato è stato quindi diluito in acqua in maniera da ottenere una diluizione iniziale pari a 10^{10} copie plasmidiche / μl . Tale soluzione è quindi stata sottoposta a diluizioni successive di un fattore 10 per ottenere concentrazioni plasmidiche decrescenti di un logaritmo fino al valore di 10^1 . La curva standard per la reazione di PCR Real Time è stata costruita amplificando 5 μl delle diluizioni comprese tra 10^6 e 10^1 contenenti quindi, all'inizio della reazione, 5×10^6 e 5×10^1 molecole di plasmide rispettivamente. Al termine della reazione d'amplificazione il software correla i valori di fluorescenza al numero di copie presenti inizialmente e, mediante una retta di regressione, è in grado di determinare il numero di copie di cDNA presenti in ogni campione analizzato.

5.4 Determinazione dei livelli di mRNA mediante Real Time PCR

Sull'RNA estratto e retroscritto in cDNA è stata eseguita la quantificazione dell'mRNA utilizzando il sistema ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer), un unico strumento risultante dalla combinazione di un termociclatore, di un rilevatore fluorescenza laser e di software applicativi specifici.

La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando come sistemi di rilevazione il sistema in sonda ed il sistema UPL.

Il sistema TaqMan™ utilizza sonde oligonucleotidiche a doppia marcatura con sequenze non più lunghe di 25-30 basi, disegnate in modo tale che siano complementari alle regioni geniche bersaglio della reazione di quantificazione. Le sequenze oligonucleotidiche presentano all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" (R) e all'estremità 3' un Quencher (Q). Il Reporter è rappresentato dalla 6-carbossifluorescina o FAM mentre il Quencher è rappresentato dalla 6-carbossitetrametilrodamina o TAMRA. Quando R e Q sono separate dalla corta sequenza oligonucleotidica, Q spegne la fluorescenza di R e la sonda non emette fluorescenza. Durante la reazione di amplificazione innescata dai primers specifici per il trascritto da quantificare, l'attività 5'-3' esonucleasica della Taq

polimerasi stacca l'R presente in estremità 5' della sequenza della sequenza complementare della sonda che viene quindi utilizzata per allungare l'amplificato. L'allontanamento di R da Q permette l'emissione di fluorescenza, questa aumenta in maniera direttamente proporzionale alla quantità di amplificato. Il segnale di fluorescenza emessa viene quantificata in tempo reale durante la reazione di amplificazione e la quantificazione dell'amplificato di interesse è resa possibile grazie all'estimato ed alla contemporanea analisi di una curva standard ottenuta per diluizioni seriali del cDNA da analizzare. La metodica descritta presenta elevata specificità dovuta al fatto che i primers (circa 20 paia di basi) e la sequenza nucleotidica della sonda (25-30 paia di basi) sono stati disegnati in maniera complementare al trascritto genico da quantificare.

Il sistema UPL (Universal Probe Library), Roche[®], si avvale di 165 sonde (nominate con numero progressivo da 1 a 165) della lunghezza di solo 8-9 nucleotidi, molto più corte quindi delle classiche sonde TaqMan[™] (25-35 nucleotidi). Le sonde UPL sono marcate con i fluorofori FAM-TAMRA e sono inoltre coniugate alla sequenza LNA (Locked Nucleic Acid) che conferisce stabilità di legame una volta che la sonda si sia appaiata al DNA bersaglio. Le sonde UPL sono prevalidate in silico per quantificare trascrizioni di circa 7000 geni di sei specie diverse (uomo, topo, ratto, primati, Drosophila, Arabidopsis), garantendo per ciascuno di essi una specificità di appaiamento tra il 95 ed il 99%. Ogni UPL quindi può legare più trascritti. La specificità di reazione tuttavia viene garantita dalla combinazione di una specifica UPL e dalla coppia di primer disegnata per il gene da amplificare. Primer e sonde utilizzate sono indicate nella Tabella 2 e nella Tabella 3.

Le reazioni di amplificazione dei trascritti mediante Real-Time PCR sono state allestite in un volume finale di 25 µl di una miscela costituita da: 12,5 µl di 2x Universal PCR TaqMan[™] Master Mix (Applied Biosystems), 0,1 µM di ciascun primer (Sigma-Aldrich), senso e antisenso, 0,4 µM di sonda (Roche[®]) 10 ng di retrotrascritto.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte utilizzando il termociclatore ABI PRISM[™] 7700 Sequencer Detector (Applied Biosystems) seguendo quattro fasi successive: 2 minuti a 50°C per attivare l'enzima Uracil-N-glicosilasi al fine di rimuovere gli uracili eventualmente presenti nel campione; 10 minuti a 95°C necessari per denaturare il DNA ed attivare la Taq polimerasi; 1 minuto alla temperatura di melting specifica per ciascuna coppia di primers, allo scopo di favorire l'amplificazione del trascritto, le fasi sono state ripetute per 35 cicli.

Tabella 2: Sequenza dei primer murini utilizzati per PCR

Gene	Sequenze di oligonucleotidi	Ta (°C)	UPL	Amplicone
RELM β	5' -tgctagtgtcaaaagccaagg-3' 5' -accacagccatagccacaa-3'	60	3	85 pb
REGIII β	5' -tggattggggctccatgac-3' 5' -aaagcacggtctaaggcagta-3'	60	55	128 pb
REGIII γ	5' -acctcaccatcatgtcctg-3' 5' -gggcacatcttcttgcaac-3'	60	60	85
GADPH	5' -tgctagtgtcaaaagccaagg-3' 5' -accacagccatagccacaa-3'	60	60	73pb

Tabella 1: Sequenza dei primer umani utilizzati per PCR

Gene	Sequenze di oligonucleotidi	Ta (°C)	UPL	Amplicone
RELM β	5'-tctttcctttcatccttctgct-3' 5'-aggagatcgtcttaggctctg-3'	60	3	85 pb
β D1	5' -tgctagtgtcaaaagccaagg-3' 5' -accacagccatagccacaa-3'	60	86	121pb
HDEFA6	5' -accctcgaaatccgccattc-3' 5' -accgttttgactgcaacgttcca-3'	60	68	87pb
GAPDH	5' -aggccttcgctgccgtaacaa-3' 5' -cctggactgcaacgggttgcaaat-3'	60	60	132pb

6. Quantificazione di citochine tramite Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (E.L.I.S.A.)

Il test E.L.I.S.A. è un dosaggio immunoenzimatico che unisce la specificità degli anticorpi alla sensibilità della lettura spettrofotometrica dell'attività dell'enzima HRP (perossidasi della radice di rafano) in presenza di un substrato facilmente ossidabile. L'ELISA può essere utilizzata per dosare antigeni sia mediante il metodo competitivo, che con il metodo del doppio anticorpo e per dosare un anticorpo specifico mediante un metodo indiretto. Il metodo competitivo prevede la competizione tra antigene libero e antigene marcato con l'enzima, che competono con un anticorpo legato su una fase solida. Dopo incubazione con il substrato per l'enzima si misura l'attività enzimatica che è inversamente proporzionale alla quantità di antigene che è presente nel campione.

Il metodo non competitivo prevede che l'antigene di cui si vuole determinare la quantità presenti almeno due epitopi, cioè deve essere polivalente, poiché un epitopo lega l'anticorpo legato alla matrice (formazione dell'immunocomplesso) e il secondo lega l'anticorpo marcato per la determinazione dell'immunocomplesso. L'attività enzimatica sarà in questo caso direttamente proporzionale alla quantità di antigene del campione.

Il metodo indiretto per la determinazione di un anticorpo prevede che l'antigene sia legato alla fase solida e si aggiunge l'anticorpo da determinare, si aggiunge poi l'anticorpo anti-immunoglobulina marcato con l'enzima, il substrato dell'enzima e si valuta l'attività enzimatica che risulta direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo nel campione. In tutti i casi è necessario fare una retta di taratura con concentrazioni note di antigene/anticorpo. Si deve inoltre valutare il segnale aspecifico (Non Specific Bound-NSB), che non deve superare il 5%, che può essere dovuto all'impurità del tracciante, all'adsorbimento sulla piastra, all'intrappolamento fisico del ligando libero col complesso legato. Il NSB viene valutato effettuando il dosaggio sul solo tracciante, questo verrà poi sottratto ai campioni e alla retta di taratura. La sensibilità di ogni tipo di ELISA può essere inoltre aumentata attraverso amplificazione enzimatica. Si può impiegare una reazione enzimatica accoppiata in cui il prodotto di una prima reazione diviene il substrato di una seconda reazione, oppure si può utilizzare il sistema avidina-biotina: dopo che gli anticorpi specifici si sono ancorati alla fase solida, ed è avvenuto il legame con l'antigene specifico, si aggiunge l'anticorpo secondario marcato con la biotina, e poi l'avidina marcata con l'enzima. Aggiunto il substrato per l'enzima, si osserva che in condizioni standard l'attività enzimatica misurata è proporzionale alla quantità di antigene specifico presente nel campione in esame. In questo studio è stato impiegato l'ELISA metodo non competitivo per la determinazione dei livelli di IL-1 β , TNF- α .

Preparazione dei campioni:

10mg di tessuto murino (Ileo, Grasso, Fegato) sono stati omogenati in 250 μ l di Buffer Fosfato contenente Inibitore delle Proteasi (Chalbiochem), centrifugati a freddo a 13.000 xg per 10 minuti, il surnatante è stato prelevato e utilizzato per la quantificazione proteica.

Esecuzione del saggio:

La determinazione è stata eseguita con l'utilizzo di kit specifici per le quattro proteine da determinare: mouse, TNF- α , IL-6 Antibody Pair (Arcus Biologicals, Milano), mentre per la Leptina è stato utilizzata la coppia di anticorpi ed il relativo standard fornito da KomaBiotech. Ogni campione è stato analizzato almeno in duplicato. Micropiastre da 96 pozzetti ad alta capacità di legame (Costar) sono state incubate con Coating Antibody alla concentrazione di 2,6 μ g/ml in PBS 1X a 4°C overnight. L'anticorpo non legato ai pozzetti è stato rimosso e i siti di legame aspecifici sono stati bloccati mediante incubazione con blocking buffer (PBS 1X con 0,5% BSA e 0,1% Tween-20) per 2 ore a

temperatura ambiente. Dopo lavaggio con washing buffer (KH_2PO_4 0,02%, K_2HPO_4 0,19%, EDTA 0,04%, Tween-20 0,05%, pH 7,4) nei pozzetti sono stati aggiunti i campioni e parallelamente è stata allestita una curva standard con diluizioni successive 1:2 della citochina di interesse partendo da una concentrazione di 2000 pg/ml fino ad arrivare alla concentrazione di 0 pg/ml. Successivamente è stato aggiunto l'anticorpo secondario coniugato alla biotina e la piastra è stata quindi incubata per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo lavaggio con il buffer di lavaggio, i pozzetti sono stati incubati per 30 minuti con streptavidina coniugata a HRP, diluita 1:1250 in PBS 1X con 0,5% BSA e 0,1% Tween-20. È stato effettuato un ultimo lavaggio con il buffer di lavaggio seguito da incubazione al buio con il substrato tetrametilbenzidina (TMB solution). La reazione è stata quindi bloccata con HCl diluito 1:5 in acqua. La lettura dell'assorbanza è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 450nm, tramite un lettore per micro piastre (Sunrise, Tecan)

7. Colture di cellule epiteliali intestinali umane (Caco2)

Quale linea epiteliale intestinale umana è stata utilizzata la linea CaCo2, cellule epiteliali di adenocarcinoma colon rettale. Le cellule sono state poste in coltura in fiasche da 75 cm² (Cellstar ®) in terreno DMEM completo (DMEM addizionato di 10% v/v di Fetal Bovine Serum, Gibco, inattivato per 30 minuti a 56°C, Penicillina, 100 U /ml, Streptomina, 100 µg/ml, Fungizone, 1 µg/ml, ed L-Glutamina, 2mM) a 37°C, 5% CO₂. Il terreno è stato sostituito ogni tre giorni, quando le cellule hanno raggiunto la confluenza, sono state tripsinizzate con 4 ml di Tripsina/EDTA (Gibco BRL) per 5 minuti. Le cellule sono state così raccolte, lavate in PBS mediante centrifugazione e poste in nuove fiasche o in piastre da sei pozzetti in terreno DMEM completo.

7.1 Determinazione dell'espressione di peptidi antimicrobici in CaCo2 stimulate con hRELMβ

Cellule epiteliali intestinali CaCo2 sono state seminate su piastre da 6 pozzetti (Costar). Raggiunta la confluenza sono state lavate con PBS (Buffer Fosfato 1x) a pH 7,4, e addizionate di terreno DMEM *free* ossia senza antibiotico e senza FBS, ed incubate a 37°C per 24 ore. Trascorso il tempo previsto, le cellule sono state stimulate con la proteina ricombinante umana hRELMβ (Chalbion) a diverse concentrazioni (10 µM, 1 µM, 0,1 µM e 0,01 µM) e a diversi tempi di stimolazione (3, 6, 12, 24 ore). Trascorso il tempo di stimolazione previsto, il surnatante è stato raccolto e conservato a -80°C per il saggio di attività antimicrobica, le cellule sono state lavate con PBS 1x e successivamente staccate dal pozzetto tramite apposito *scraper*, raccolte in eppendorff, centrifugate a freddo a 13000

xg per 1 minuto, il surnatante rimosso ed il pellet conservato a -80°C per la successiva estrazione dell'RNA totale .

7.2 Determinazione dell'espressione di RELM β in CaCo2 stimulate con *Lactobacillus crispatus* M247

Il ceppo batterico *Lactobacillus crispatus* M247 è stato fornito da A.A.T.-Advanced Analytical Technologies S.r.l. Questi è stato cresciuto in terreno liquido selettivo per batteri lattici (MRS), il giorno precedente l'esperimento è stato preparato un inoculo in terreno liquido che è stato fatto crescere per 24 ore a 37°C in condizioni di anaerobiosi. Al termine della coltura è stata misurata la densità ottica ($\lambda= 620$) del campione per verificare la concentrazione batterica.

Le cellule epiteliali intestinali CaCo₂ sono state seminate su piastre da 6 pozzetti (Costar). Raggiunta la confluenza sono state lavate con PBS (Buffer Fosfato 1x) a pH 7.4, e addizionate di terreno DMEM *free* ossia senza antibiotico e senza FBS, ed incubate a 37°C per 24 ore. Trascorso il tempo previsto, le cellule sono state stimulate con 10⁸ CFU di *Lactobacillus crispatus* M247 per un ora a 37°C in atmosfera controllata al 5% di CO₂. Dopodiché le cellule sono state lavate con PBS a pH7.4 e incubate per 12 ore in terreno DMEM con antibiotico.

Trascorso il tempo previsto, il terreno è stato tolto e sostituito con DMEM addizionato di Acido Stearico (0,5 μ M, Sigma-Aldrich) e BSA e lasciate ad incubare per altre 12 ore a 37°C, al termine delle quali le cellule sono state lavate con PBS 1x e successivamente staccate dal pozzetto tramite apposito *scraper*, raccolte in eppendorff, centrifugate a freddo a 13000rpm per 1 minuto, il surnatante rimosso ed il pellet conservato a -80°C per la successiva estrazione dell'RNA totale.

8. Saggio di Attività Antimicrobica sul surnatante di cellule CaCo2

L'attività antimicrobica dei peptidi prodotti dalle CaCo₂ in seguito a stimolazione con la proteina ricombinante umana RELM β , è stata valutata tramite il *colony-forming (CFU) assay* (Wittoft MD, et al 2005). Il ceppo batterico di *Escherichia coli* è stato coltivato in terreno LB (Luria Bertani) liquido per 16-18 ore a 37°C con lieve agitazione (150 oscillazioni minuto), trascorse le quali è stata determinata la densità ottica ($\lambda= 620$) del campione allo scopo di verificare la concentrazione batterica. Una quantità pari a 1x10⁹ di batteri sono stati centrifugati, lavati due volte con PBS 1x, e risospesi in 1ml di PBS sterile. Cinquecento μ l di surnatante cellulare di cellule CaCo₂ poste in coltura in terreno DMEM senza antibiotico e senza FBS e stimolato a diverse concentrazioni della proteina ricombinante hRELM β è stato posto a diretto contatto con lo stesso volume di PBS 1x contenente i batteri alla concentrazione di 1x10⁸ e lasciati in agitazione a 37°C per 2 ore. Trascorso il tempo richiesto per ciascun campione sono state effettuate una diluizioni seriali e quindi 50 μ l delle

diluizioni 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} sono state seminate su piastre di LB-Agar. Le piastre sono state lasciate ad incubare a 37°C per 18 ore. Le colonie cresciute sono state contate ed è stata calcolata la CFU (Colonie Forming Unit) per ogni condizione.

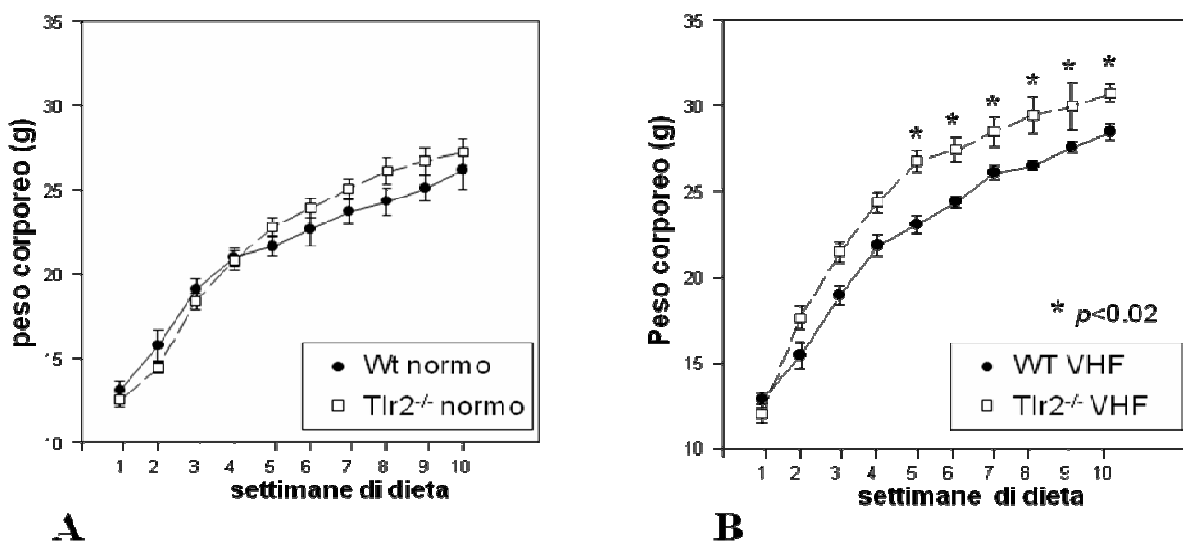
Risultati

1. Valutazione dell'andamento del peso corporeo

Animali Wild-type (WT) e deficienti per il recettore TLR2 sono stati allocati a ricevere una dieta standard normocalorica o ricca di grassi (Very High Fat-VHF) a partire dalla seconda settimana di vita quando, quando, come riportato nel grafico in figura 1, registravano un peso corporeo di circa 14 grammi. Ogni gruppo sperimentale era composto da almeno 20 topi. Il peso è stato registrato settimanalmente così come il cibo aggiunto nel corso del trattamento. Il peso corporeo dei topi WT posti a dieta normocalorica aumenta in maniera fisiologica di 13,09 grammi nel corso delle 10 settimane di esperimento (Fig.1 A), passando da 13,07 grammi della prima settimana a 26,16 alla decima settimana. L'incremento di peso dei topi posti invece a dieta VHF è invece risultato essere di 15,62 grammi. Tali animali infatti hanno raggiunto dopo 10 settimane un peso corporeo pari a 28,5 grammi. La differenza di incremento di peso corporeo nei topi WT a dieta VHF e normocalorica risulta essere statisticamente significativa dalla sesta settimana di dieta ($p < 0,02$).

Nei topi TLR2^{-/-} posti a dieta normocalorica invece, l'incremento nelle 10 settimane è stato di 16,18 grammi (Fig.1 A) passando da 11,52 grammi della prima settimana di dieta a 27,7 grammi al termine del trattamento. I topi TLR2^{-/-} posti a dieta VHF invece, è risultato essere di 18,72 grammi, raggiungendo un peso corporeo alla decima settimana di 30,75 grammi. La differenza di peso corporeo nei topi TLR2^{-/-} a dieta VHF risulta essere statisticamente significativa a partire già dalla seconda settimana di dieta ($p < 0,02$) (Fig.1 B).

Figura1: Andamento del peso corporeo in topi WT e TLR2^{-/-} a dieta normo (A), a dieta VHF (B).

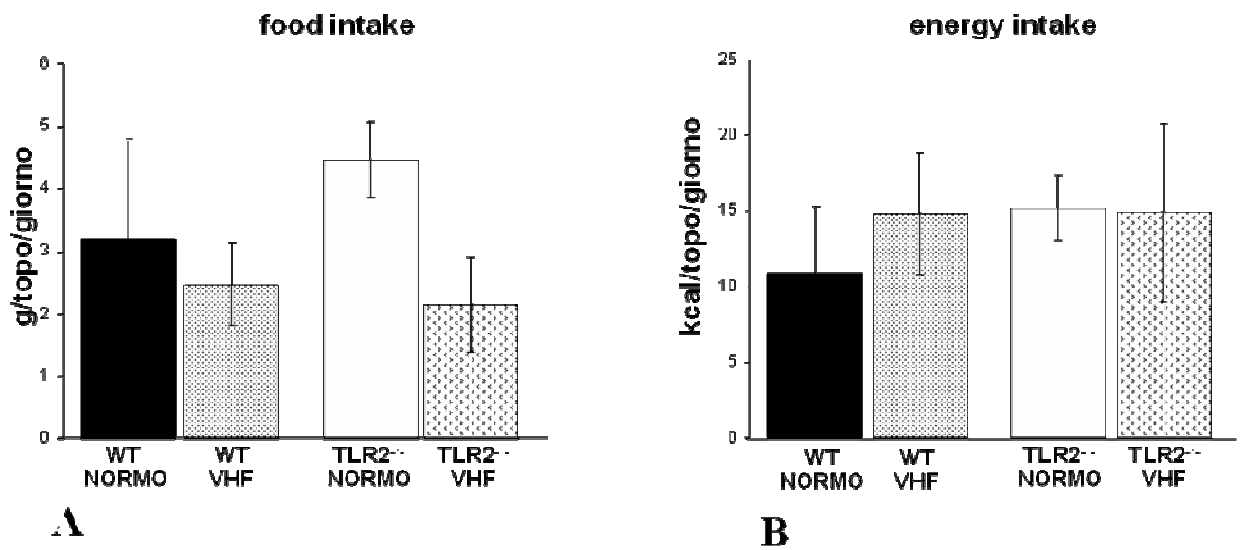


2. Valutazione dell'introito calorico giornaliero

Durante le dieci settimane di trattamento sono state monitorate le successive aggiunte di cibo agli animali trattati al fine di valutarne alla fine del trattamento il *food intake* (l'assunzione di cibo) e l'*energy intake* (le calorie assunte) dei topi.

Nella figura 2 sono riportati i valori rispettivamente di *food intake* ed *energy intake*: i topi TLR2^{-/-} a dieta normocalorica presentavano un introito di cibo superiore ai topi degli altri trattamenti, tuttavia l'*energy intake* risulta essere statisticamente paragonabile tra i diversi trattamenti, eccezion fatta per i topi WT dieta normo che registravano un'assunzione calorica al giorno minore rispetto agli altri gruppi.

Figura2: Assunzione di cibo per topo *pro die* (A); assunzione di calorie per topo *pro die* (B).

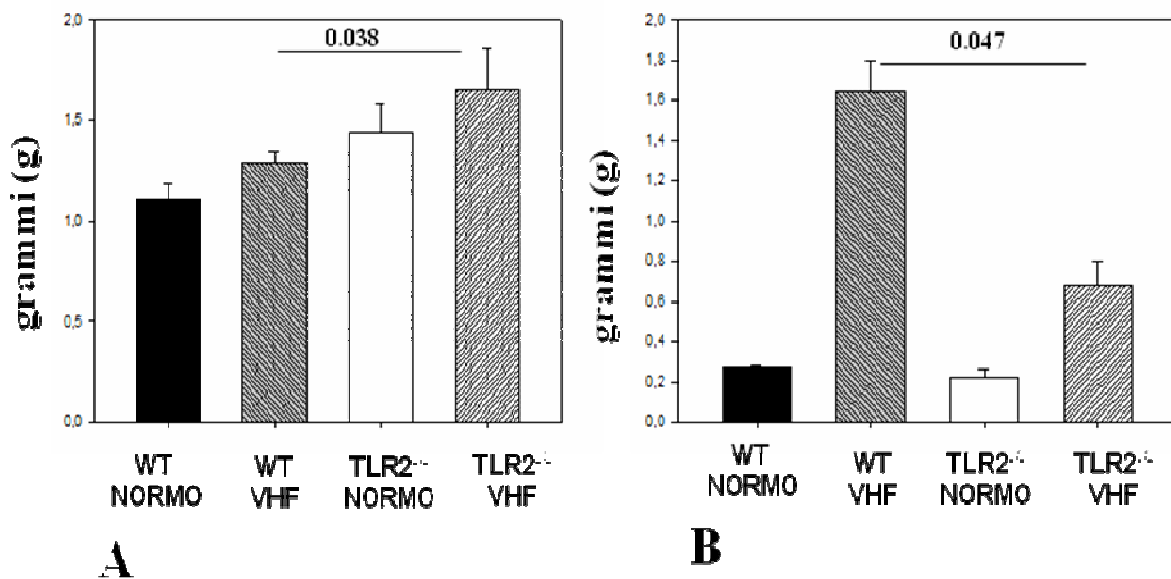


3. Valutazione del grasso peso del totale e del peso del fegato

Per determinare l'entità dell'accumulo di grasso negli animali, al termine del trattamento il grasso totale (epididimale, mesenterico e sottocutaneo) è stato rimosso e pesato. Analogamente per una valutazione della statosi epatica, il fegato di ciascun animale è stato rimosso e pesato.

Nella figura 3 sono riportati i valori del peso rispettivamente di fegato e grasso nei topi WT e TLR2^{-/-} a dieta normocalorica e VHF. Il peso del grasso totale aumenta sia nei topi WT che TLR2^{-/-} a dieta VHF, rispetto ai topi a dieta normocalorica. Tuttavia, l'accumulo di tessuto adiposo è significativamente minore nei topi TLR2^{-/-} rispetto ai WT a dieta VHF. Al contrario, il peso del fegato risulta significativamente aumentato nei topi TLR2^{-/-}VHF rispetto ai topi WT a dieta normocalorica.

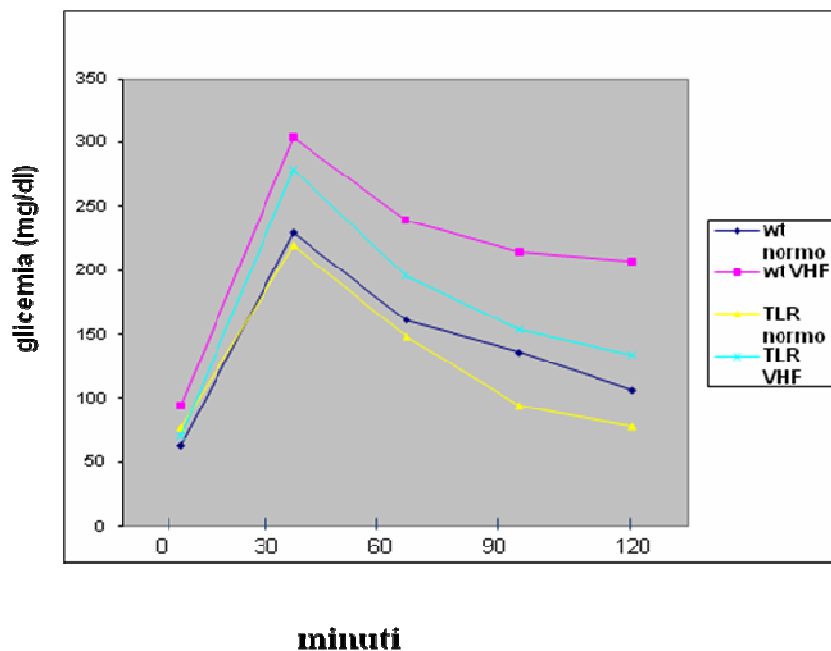
Figura 3 Peso del fegato (A) e del grasso (B) di topi WT e TLR^{-/-} a dieta normo e VHF.



4. Valutazione della tolleranza al glucosio

I test di tolleranza al glucosio sono stati eseguiti in topi WT e TLR2^{-/-} a dieta normo e VHF a dieci settimane dall'inizio della dieta. I topi sono stati posti a digiuno 16 ore prima che venisse effettuato il test. La concentrazione ematica di glucosio è stata valutata al tempo 0, ossia prima della somministrazione del glucosio (1,75g per rkg di peso corporeo) per via orale e dopo 30, 60, 90 e 120 minuti dalla somministrazione. Per ogni gruppo sperimentale sono stati saggiati almeno tre animali. Dopo 30 minuti dalla somministrazione del carico di glucosio i livelli glicemici dei topi WT a dieta normocalorica presentano un iniziale fisiologico incremento che ritorna a valori prossimi a quelli iniziali dopo 120 minuti, dimostrando che in questi animali i sistemi di controllo glicemico risultano normali. Nei topi WT tenuti a dieta VHF, il test permette di evidenziare un incremento glicemico particolarmente elevato dopo 30 minuti dalla somministrazione dello zucchero. In questi animali, inoltre, la glicemia non rientra nei valori normali dopo 120 minuti dall'inizio del test, mostrando quindi una forte incapacità di tollerare il glucosio somministrato. Nei topi le determinazioni glicemiche effettuate a dieci settimane di dieta evidenziano invece che, indipendentemente dalla dieta, la curva glicemica risulta del tutto normale, con un aumento della glicemia a 30 minuti che tuttavia tende subito a raggiungere i valori di partenza (Fig.4).

Figura 4: ...Test di tolleranza al glucosio: livelli di glucosio nel sangue in topi WT e TLR^{-/-} a dieta normo e VHF.



I valori determinati attraverso la curva da carico di glucosio possono essere meglio espressi tramite il calcolo dell'aria sottesa alla curva (AUC) (Fig.5):

$$AUC = (A + B \times 2 + C \times 2 + D \times 2 + E) / 2 - A \times 4$$

Dove : A è la concentrazione iniziale di glucosio (tempo 0)

B è la concentrazione di glucosio a 30 minuti

C è la concentrazione di glucosio a 60 minuti

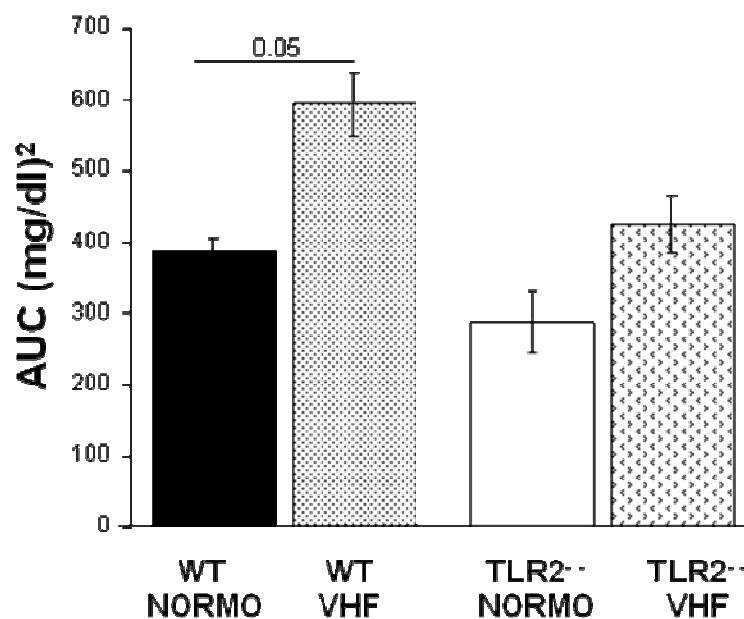
D è la concentrazione di glucosio a 90 minuti

E è la concentrazione di glucosio a 120 minuti

I valori di AUC hanno un andamento direttamente proporzionale all'intolleranza al glucosio.

Dopo 10 settimane di dieta, topi WT a dieta VHF presentano una intolleranza al glucosio statisticamente aumentata rispetto ai topi WT a dieta normocalorica ($p < 0,05$). Al contrario nei topi TLR2^{-/-}, indipendentemente dalla dieta non si evidenziano differenze statisticamente significative.

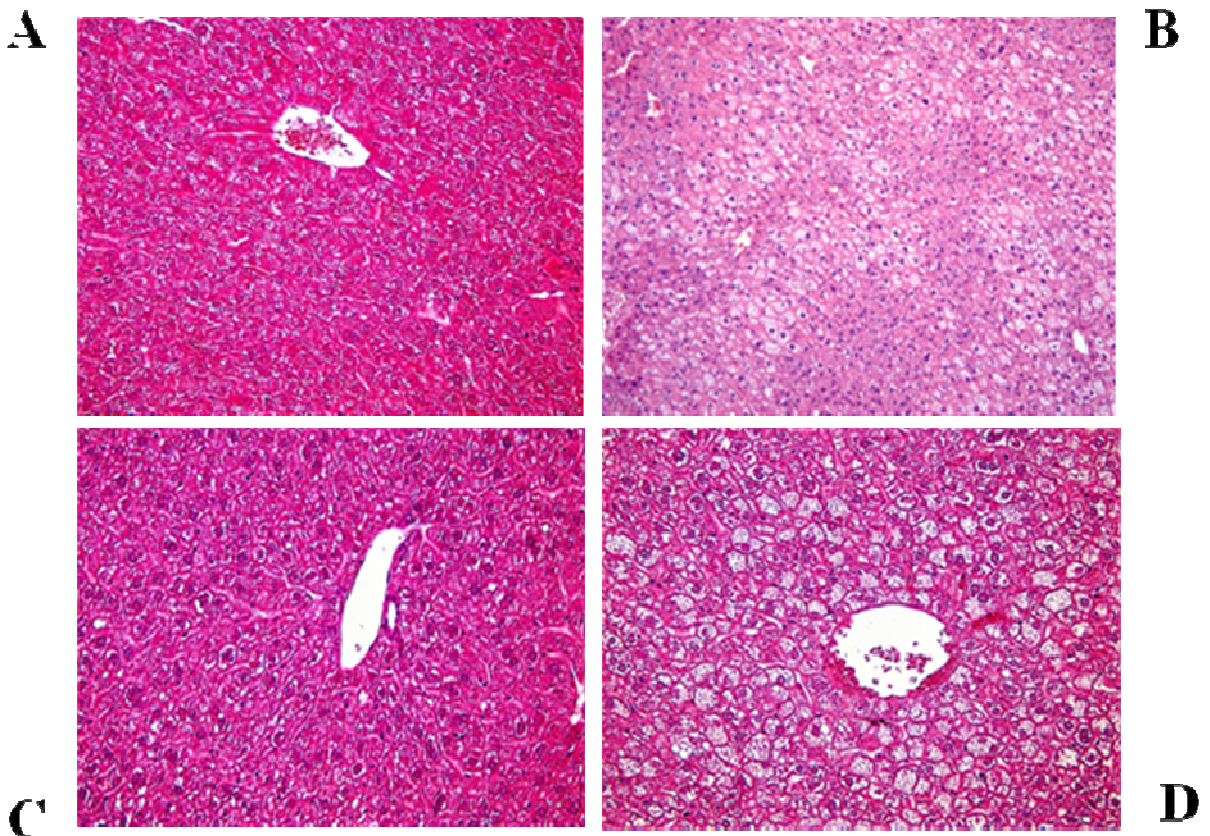
Figura 5: Valori di AUC in topi WT e TLR2^{-/-} normo e VHF.



5. Valutazione istologica della steatosi epatica

Al fine di valutare la severità della steatosi epatica (accumulo lipidico all'interno dei lobuli epatici), campioni di fegato asportati da topi WT e TLR2^{-/-} a dieta normocalorica e VHF, sono stati inclusi in paraffina e colorati con ematossilina-eosina. Come riportato in figura 6, sezioni epatiche ottenute da topi WT e TLR2^{-/-}tenuti a dieta normocalorica non evidenziano depositi lipidici intra-epatocitari, quadro che invece risulta essere evidente negli stessi ceppi tenuti a dieta VHF. Inoltre, i topi TLR2^{-/-} a dieta VHF riportano una steatosi epatica più estesa con deposizioni lipidiche macro-vescicolari che interessano l'intero lobulo epatico (Fig 6)

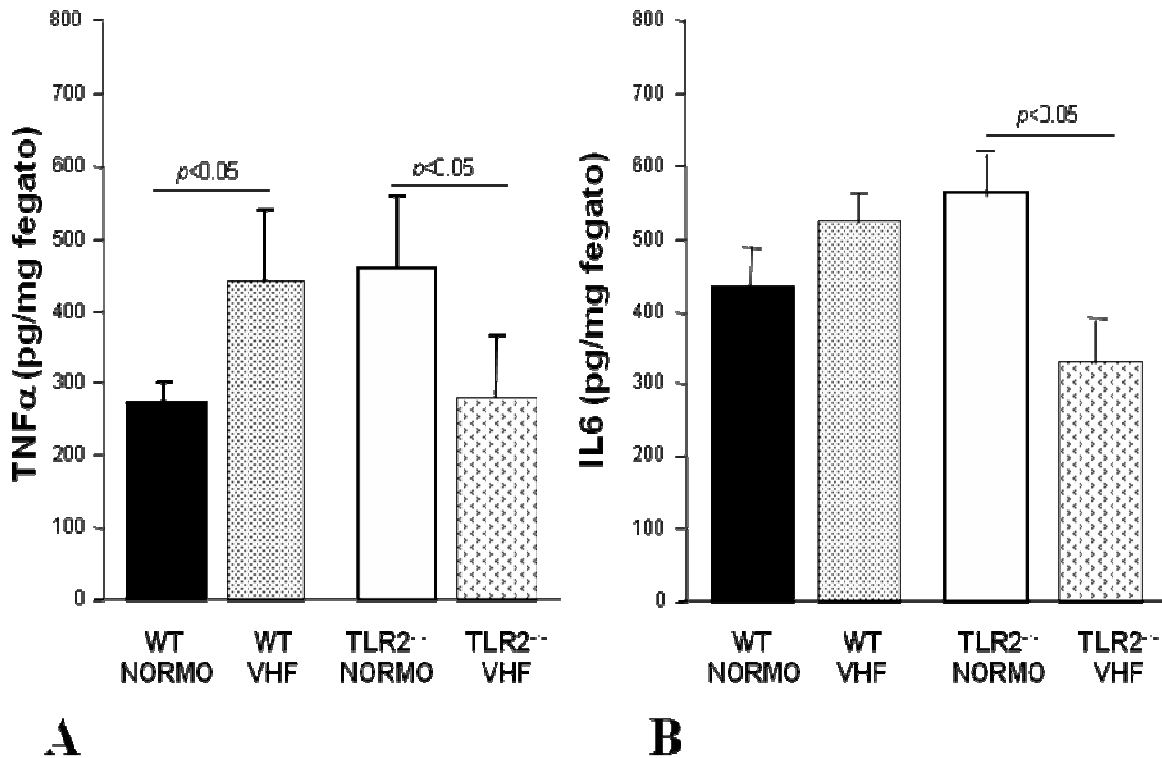
Figura 6: Sezioni di fegato di WT normo (A), WT VHF (B), TLR^{-/-} normo (C), TLR VHF (D)



6. Valutazione dei livelli di TNF- α e IL-6 nel fegato

Il dosaggio mediante ELISA dei livelli di TNF- α e IL-6 nel fegato dei topi WT e TLR2 $^{-/-}$ a dieta normocalorica e grassa mostra un aumento significativo di citochine nei topi WT obesi. Al contrario, nei topi TLR2 $^{-/-}$ i livelli di citochine risultano più elevati negli animali che hanno seguito una dieta normocalorica, e presentano una diminuzione statisticamente significativa nel caso di dieta VHF.

Figura 7: valutazione dei livelli proteici di TNF- α (A) e IL-6 (B) nel fegato di topi WT e TLR2 $^{-/-}$ normo e VHF



7. Studio della flora intestinale mediante DGGE

La composizione del microbiota è stata analizzata attraverso la determinazione dei microrganismi presenti all'interno dei campioni fecali raccolti dai ceppi murini utilizzati nei diverse condizioni sperimentali prima descritte. I campioni sono stati raccolti a diversi time (2, 4, 6 e 10 settimane) allo scopo di meglio caratterizzarne l'andamento nel tempo.

Dai campioni è stato estratto il DNA batterico, questi è stato sottoposto a PCR qualitativa tramite l'utilizzo di tre coppie di primer amplificanti la regione 16S ribosomiale delle principali divisioni batteriche presenti nell'intestino, i *Firmicutes* ed *Bacteroidetes*, e i primer amplificanti per i *Lactobacillus*. Gli amplificati così ottenuti sono stati sottoposti ad una corsa elettroforetica su gradiente di gel denaturante (DGGE) allo scopo di suddividere i frammenti di DNA, amplificati tramite PCR, in base ad una variazione nella composizione nucleotidica. I frammenti così separati e visualizzati alla luce UV sono stati rimossi dal gel, il DNA presente è stato eluito e sottoposto a sequenziamento genico per la caratterizzazione dei microrganismi presenti nei campioni analizzati.

Dall'analisi così svolta, la DGGE effettuata con amplificati della regione ribosomiale 16S del phylum *Firmicutes* (primer L140-U968) dei campioni fecali raccolti dai topi WT a dieta normocalorica e VHF mostra che tra i due gruppi si verificano delle variazioni significative nella composizione della microflora intestinale e che tali variazioni si evidenziano a partire dalla quarta settimana di trattamento (Fig.8). Questi cambiamenti precedono quindi l'incremento di peso dei topi trattati con dieta grassa rispetto ai normo. Per alcuni gruppi batterici, es *i Ruminococcus*, la somministrazione della dieta grassa non condiziona la presenza di questi gruppi a livello fecale, ma ne influenza il rapporto tra le specie. Nei topi trattati con dieta grassa è importante la comparsa di *Eubacterium dolichum* mentre specie come la *Dorea Longicatena* .è presente solo nella dieta normo. Inoltre si ha una marcata comparsa dei *Clostridi* a partire dalla sesta settimana di dieta.

Dalla DGGE effettuata sui topi TLR-/- (Fig.9). si evince invece che i profili sono meno ripetitivi rispetto ai WT, presentano quindi una microflora più diversificata. Specie come il *Ruminococcus torques* aumenta a partire dalla quarta settimana di dieta grassa importante risulta la presenza di *Clostridium* a partire dalla sesta settimana di dieta grassa. A parte queste variazioni, nei TLR-/-la dieta grassa sembra avere un impatto sulla modificazione della flora meno evidente rispetto ai WT.

Figura 8: DGGE sul modello WT normocalorica-VHF con primer universali L140-U968 (*Firmicutes*)

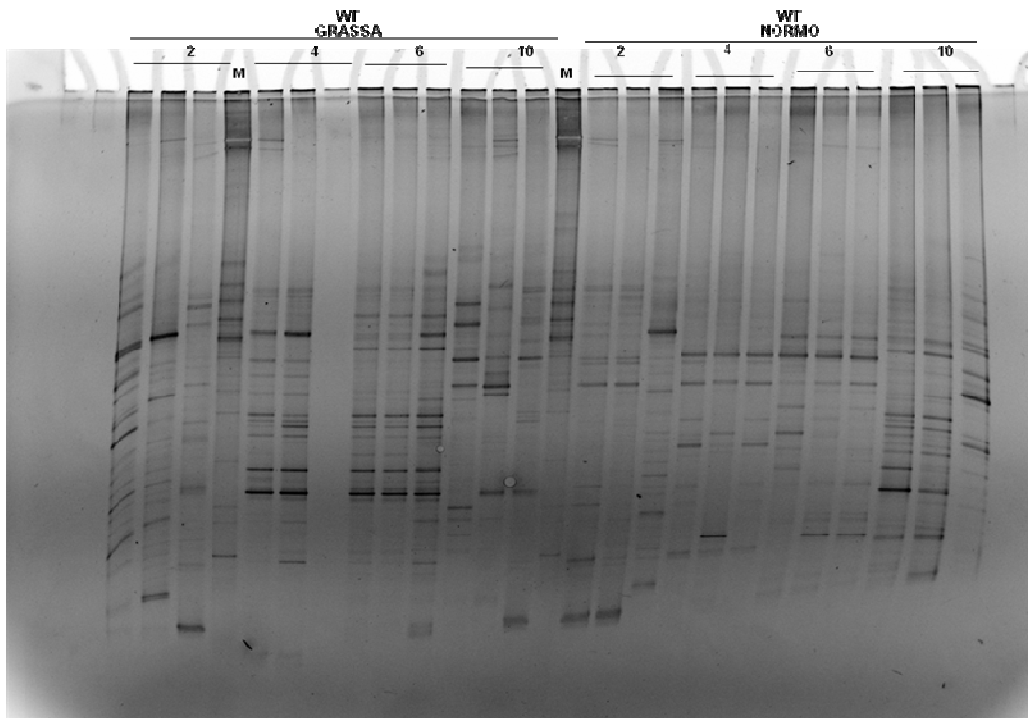
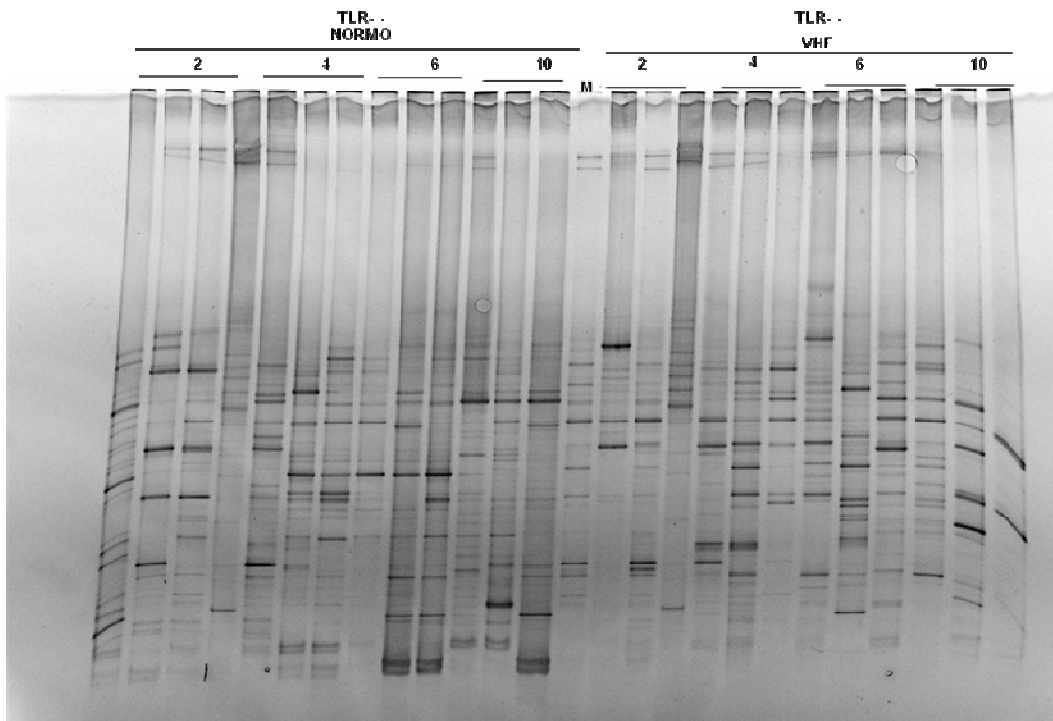


Figura 9: DGGE sul modello TLR-/- normocalorica-VHF con primer universali L140-U968 (*Firmicutes*)

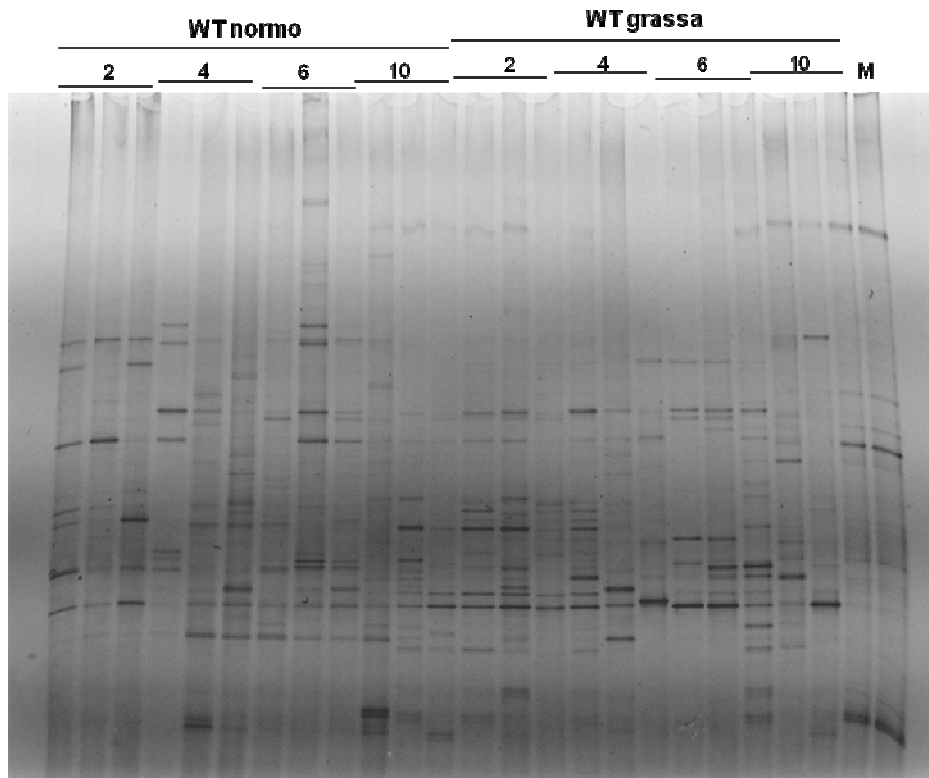


La DGGE effettuata con amplificati della regione ribosomiale 16S del phylum *Bacteroidetes* (primer P2-P3) mostra evidenti cambiamenti all'interno dei due modelli WT normocalorica e VHF. Infatti si osserva nel profilo DGGE dei topi trattati con dieta grassa la scomparsa di alcune specie abbondantemente presenti nella flora intestinale dei topi trattati con dieta normocalorica. Ad esempio, specie come il *Bacteroidetes capillosus* è presente nei topi VHF solo alle 2 settimane di dieta, poi scompare. Il *Bacteroidetes uniformis* è presente nelle feci dei topi VHF fino alla sesta settimana, poi scompare.

Alcune specie invece sono presenti nelle feci dei topi normo ma non sono mai presenti nelle feci dei topi VHF, come ad esempio il *Bacteroidetes Fragilis* ed il *Bacteroidetes intestinalis*.

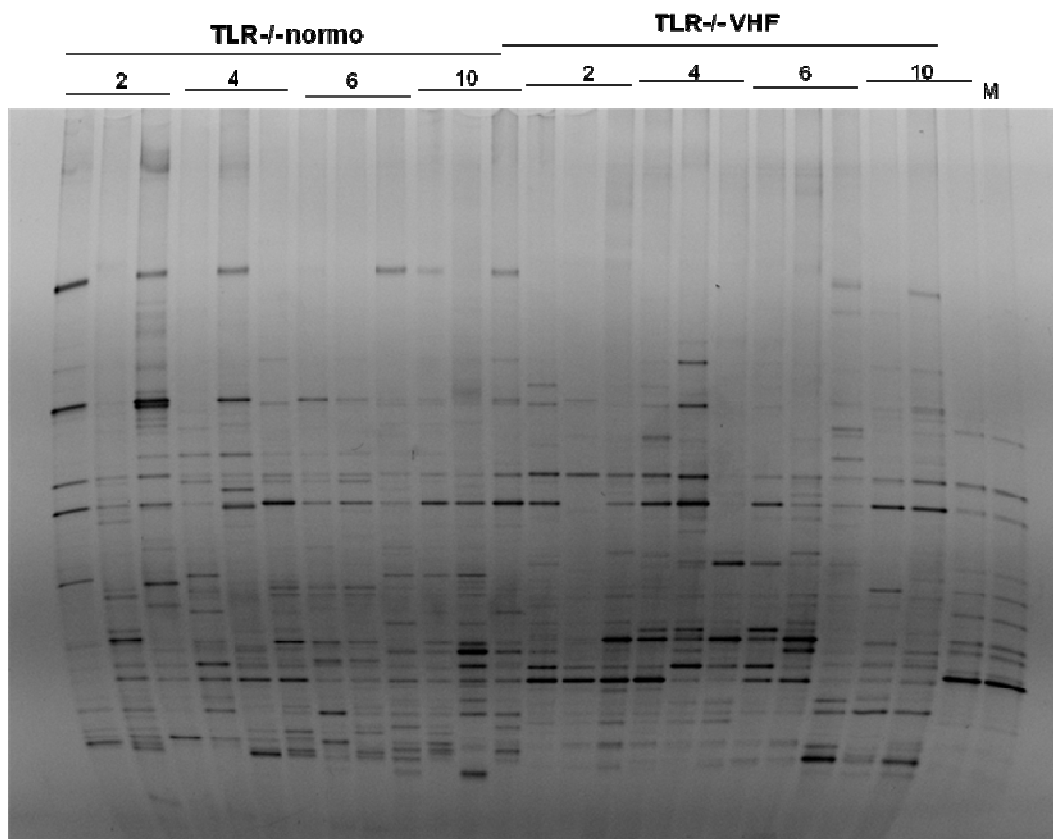
Nei WT quindi si osserva una diversificazione tra le due diete per quanto riguarda il phylum *Bacteroidetes*, in quanto la dieta grassa ne condiziona la diversificazione delle specie presenti: i topi trattati con dieta normocalorica presentano *Bacteroidetes fragilis* group, che invece scompaiono nei topi a dieta grassa dove invece prevalgono i *Bacteroidetes non-fragilis* group. (Fig.10).

Figura 10: DGGE sul modello WT normocalorica VHF con primer universali P2-P3 (*Bacteroidetes*)



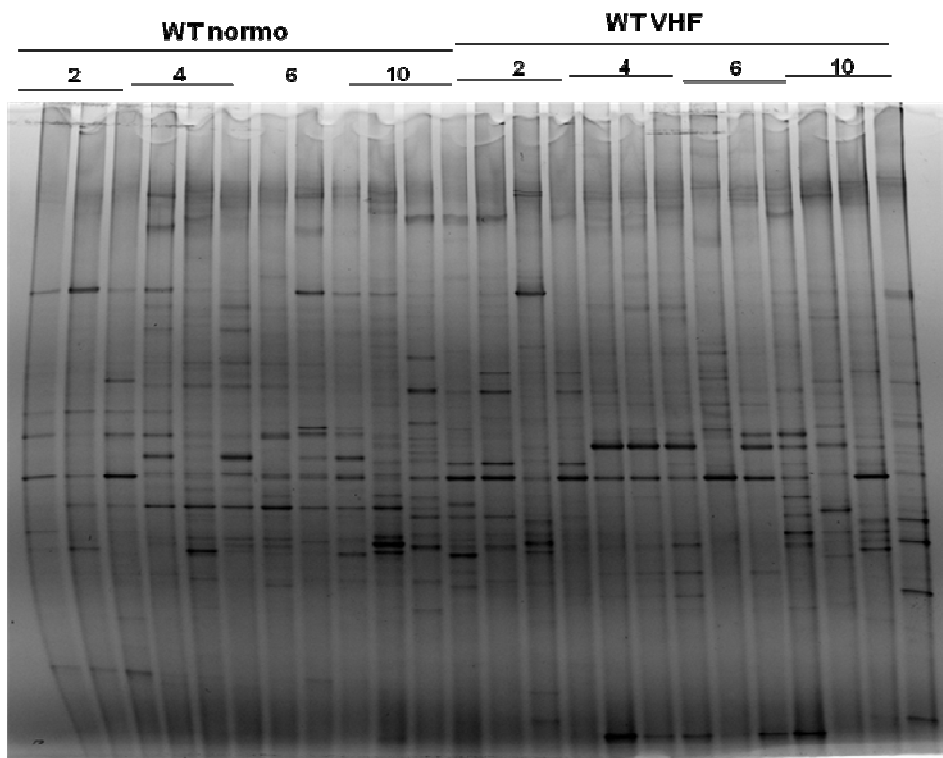
Nel profilo DGGE degli amplificati dei topi TLR2^{-/-} si nota, come nel profilo per i *Firmicutes*, una minore diversificazione delle bande, andamento confermato dal sequenziamento genico delle stesse. La dieta grassa infatti non sembra avere effetto sulla diversificazione del phylum *Bacteroidetes* come accade nei topi WT (Fig.11) . Molte specie infatti sono presenti indipendentemente dalla dieta come il *Bacteroidetes fragilis*, l'unica specie presente nei normo che scompare nei topi TLR2^{-/-} a dieta grassa è il *Bacteroidetes intestinalis*.

Figura 11: DGGE sul modello TLR^{-/-}-normo VHF con primer universali P2-P3 (*Bacteroidetes*)



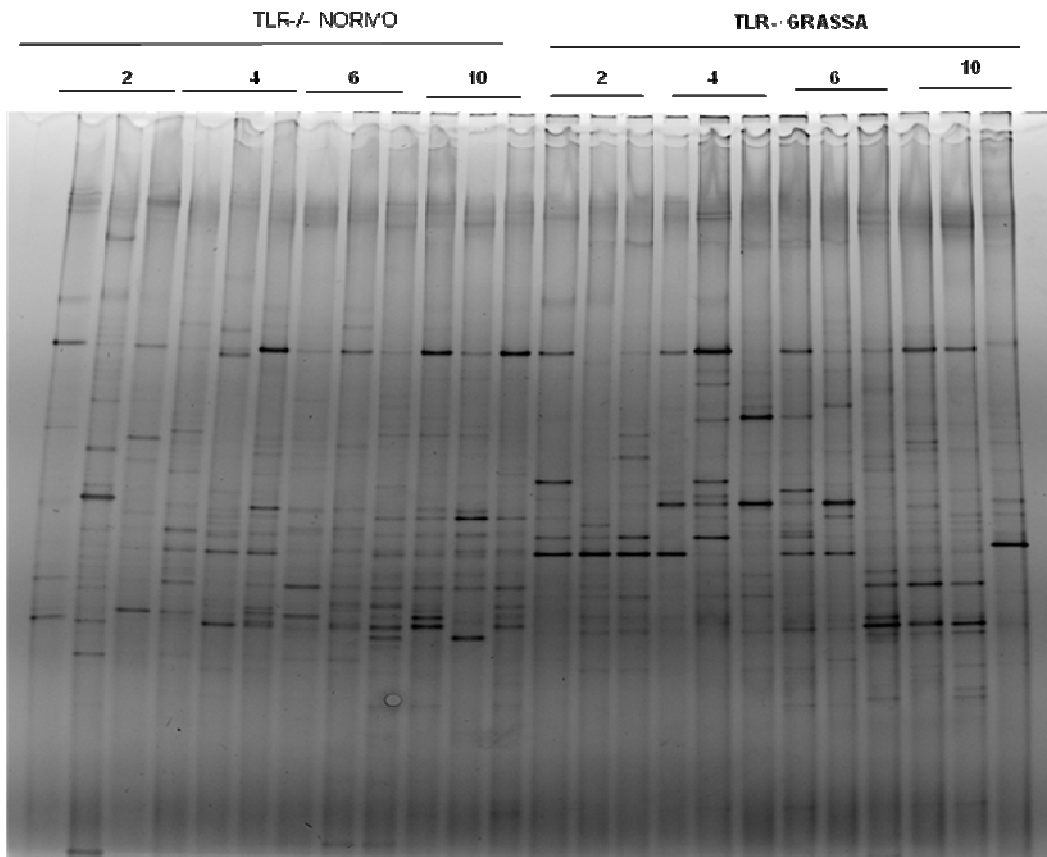
La DGGE effettuata con amplificati della regione ribosomiale 16S del gruppo dei *Lactobacillus* (primer HDA1-HDA2) mostra un effetto marcato della dieta grassa sulla presenza/assenza di questo gruppo nella flora fecale. Dall'analisi delle sequenze si evince, infatti , che il gruppo *Lactobacillus* è flora tipica dei topi a dieta normocalorica ma non dei topi a dieta VHF. Alcune specie come il *Lactobacillus gasseri* è presente nei normo e scompare totalmente nei topi a dieta grassa.

Figura 12: DGGE sul modello WT normocalorica-VHF con primer universali HDA1-HDA2 (*Lactobacillus*)



Nel profilo DGGE degli amplificati dei topi TLR2^{-/-}, anche in questo caso, non si evidenziano particolari differenze tra la dieta normocalorica e la dieta VHF. Infatti molte specie appartenenti al gruppo *Lactobacillus*, sono presenti in entrambi i gruppi come ad esempio il *Lactobacillus johnsonii*, il *Lactobacillus ruminis* ed il *Lactobacillus reuteri*, questi ultimi due addirittura aumentano nella flora dei topi VHF.

Figura 13: DGGE sul modello TLR^{-/-} normocalorica VHF con primer universali HDA1-HDA2 (*Lactobacillus*)



8. Determinazione quantitativa della flora intestinale mediante qPCR

Poiché l'analisi del microbiota mediante DGGE fornisce solo informazioni qualitative si è eseguita anche una analisi quantitativa dei gruppi microbici presenti. Il DNA fecale estratto dai campioni fecali raccolti dai topi WT e TLR2^{-/-} trattati con le due diete per diversi periodi è stato sottoposto a PCR quantitativa allo scopo di meglio quantificare le variazioni dei due principali phylum batterici costituenti il microbiota, i *Firmicutes* ed i *Bacteroidetes*.

Per l'analisi quantitativa del DNA fecale sono state utilizzate sette coppie di primer amplificanti la regione 16S ribosomiale dei principali gruppi microbici presenti a livello intestinale: *Eubacterium rectal/Clostridium coccooides* (Erec); *Clostridium leptum* (Clept), *Lactobacillus sp* (Lact), *Bacteroides sp.* (Bact), *Mouse Intestinal Bacteria* (MIB), *Segmented Filamentous Bacteria* (SFB). In particolare i primi cinque gruppi rientrano nel phylum *Firmicutes* (fisiologicamente preponderante all'interno del microbiota intestinale) mentre i restanti due gruppi fanno parte del phylum *Bacteroidetes*.

Come mostrato in figura 14, nei topi WT a dieta VHF si denota un marcato cambiamento nella composizione della flora intestinale, cambiamento già evidente a partire dalla seconda settimana di dieta dove si verifica una quasi scomparsa del gruppo dei *Lactobacillus*, alla quarta settimana il cambiamento diventa ancora più evidente e si denota una prevalenza del gruppo dei *Ruminococcus*.

I *Clostridium* sono flora preponderante della sesta settimana di dieta VHF, mentre alla decima settimana la composizione sembra diventare più diversificata.

Dall'analisi effettuata raggruppando i diversi gruppi per phylum di appartenenza (Fig.15) si può notare un cambiamento nella composizione tra *Firmicutes* e *Bacteroidetes* molto precoce, già dalla seconda settimana di dieta grassa, infatti si nota un aumento dei primi a scapito di una diminuzione dei secondi. Tale cambiamento rimane piuttosto costante fino alla decima settimana di dieta, quando i *Bacteroidetes* risultano nuovamente aumentare.

Figura 14: qPCR dei principali gruppi batterici intestinali nel DNA fecale di topi WT normocalorica e VHF

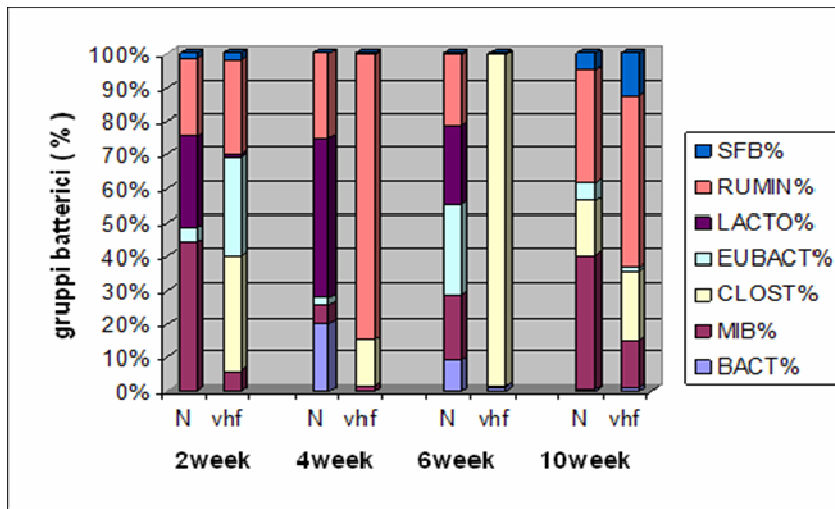
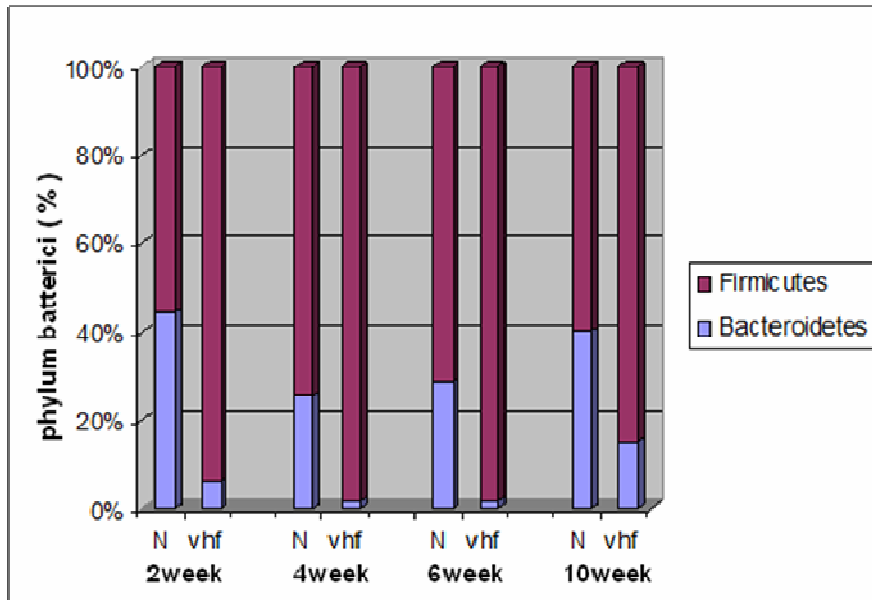


Figura 15: qPCR dei due phylum principali costituenti il microbiota di topi WT normocalorica e VHF



Contrariamente a quanto accade nei topi WT, nei topi TLR-/- l'analisi per gruppi batterici non mostra cambiamenti drastici nel senso della prevalenza preponderante di un gruppo rispetto ad un altro. (Fig 16). I Lactobacillus che scompaiono nei WT a dieta grassa, nei TLR-/- risultano invece costantemente presenti mentre i Clostridium sembrano aumentare nella dieta grassa già a partire dalla seconda settimana.

L'analisi per phylum (Fig.17), tuttavia denota un aumento del phylum Firmicutes a scapito di una diminuzione del phylum Bacteroidetes a partire dalla seconda settimana di dieta grassa, come si verifica nei topi WT a dieta grassa.

Figura 16: qPCR dei principali gruppi batterici intestinali nel DNA fecale di topi TLR-/- normocalorica e VHF

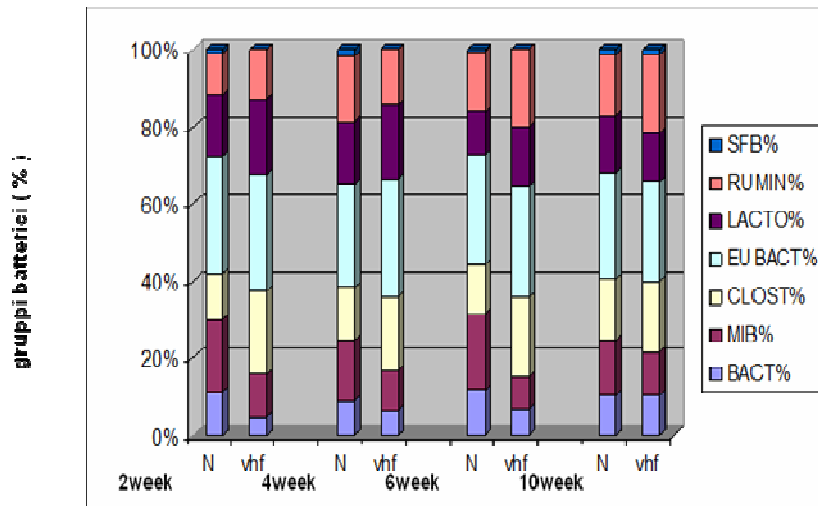
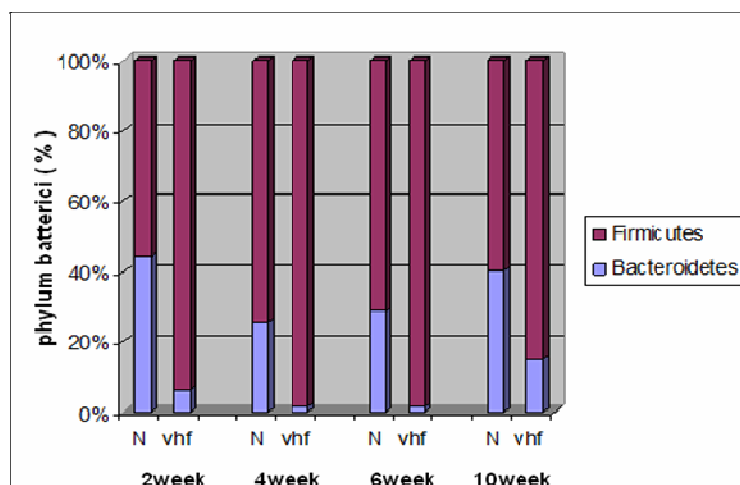


Figura 17: qPCR dei due phylum principali costituenti il microbiota di topi TLR-/- normocalorica e VHF

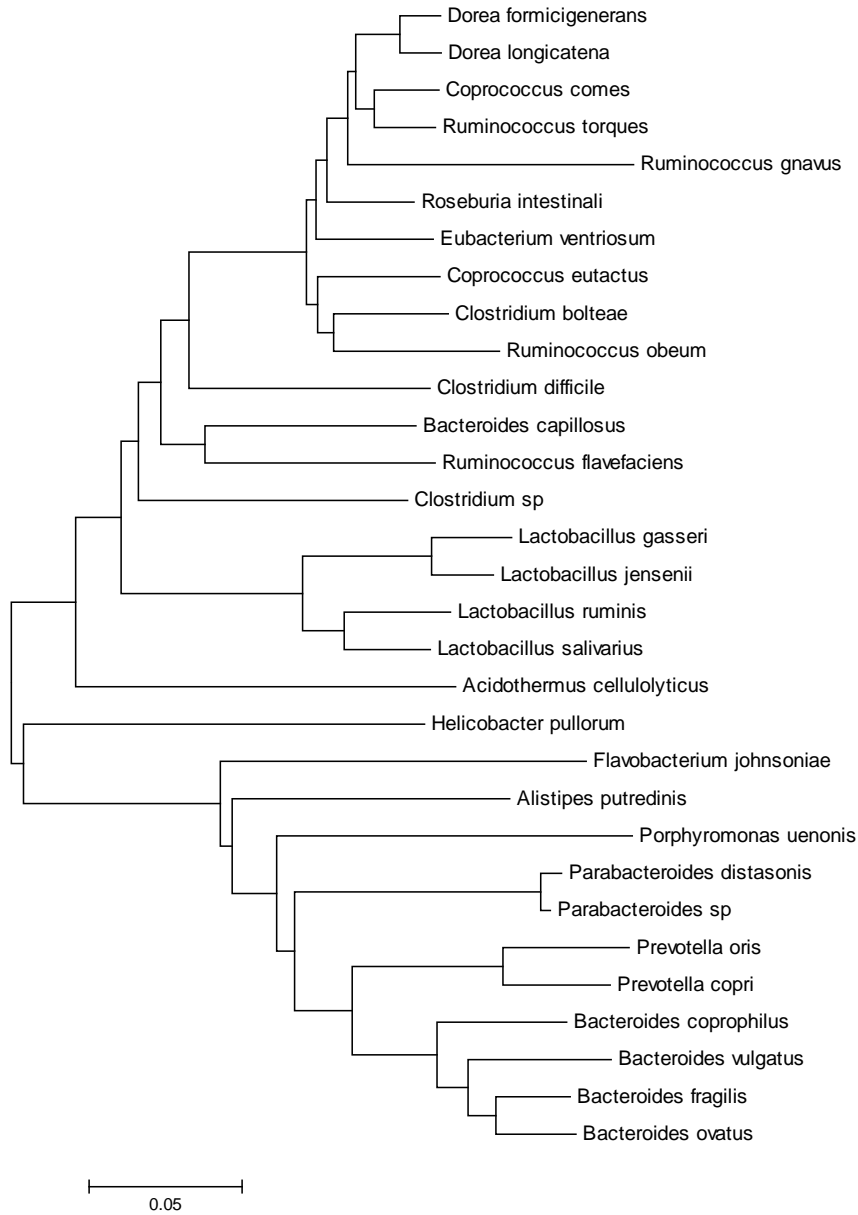


9. Analisi filogenetica della flora intestinale

Allo scopo di sintetizzare i dati ottenuti con la DGGE e con l'analisi quantitativa e di meglio comprendere il cambiamento della flora intestinale nei due modelli a dieta normocalorica e VHF, è stata effettuata l'analisi filogenetica. In particolare con l'analisi quantitativa si è posto in evidenza un cambiamento nella composizione dei due phylum (*Firmicutes* e *Bacteroidetes*) principali costituenti il microbiota, con l'analisi DGGE si è potuto individuare temporalmente nell'arco delle dieci settimane il cambiamento in esame e si sono potute identificare le specie microbiche facenti parte il microbiota dei topi utilizzati nello studio. L'analisi filogenetica è stata effettuata sulle sequenze geniche trovate mediante il sequenziamento genico delle bande separate mediante DGGE. Sono state considerate solo le sequenze presentanti il 100% di omologia con i profili del data base utilizzato al fine di evitare errori nella composizione della flora batterica (anche l'1% di diversità nella sequenza genetica può determinare l'identificazione di una specie diversa rispetto a quella effettivamente trovata). Le sequenze sono state allineate mediante il programma Clustal W al fine di identificare le regioni di omologia (regioni conservate all'interno di un phylum) tra le specie e di posizzionarle poi successivamente nell'albero in corrispondenza della ramificazione (phylum) di appartenenza. La costruzione dell'albero e l'analisi delle distanze tra le ramificazioni è stata effettuata rispettivamente tramite il software MEGA 3.1 ed il sistema di analisi Neighbor-Joining.

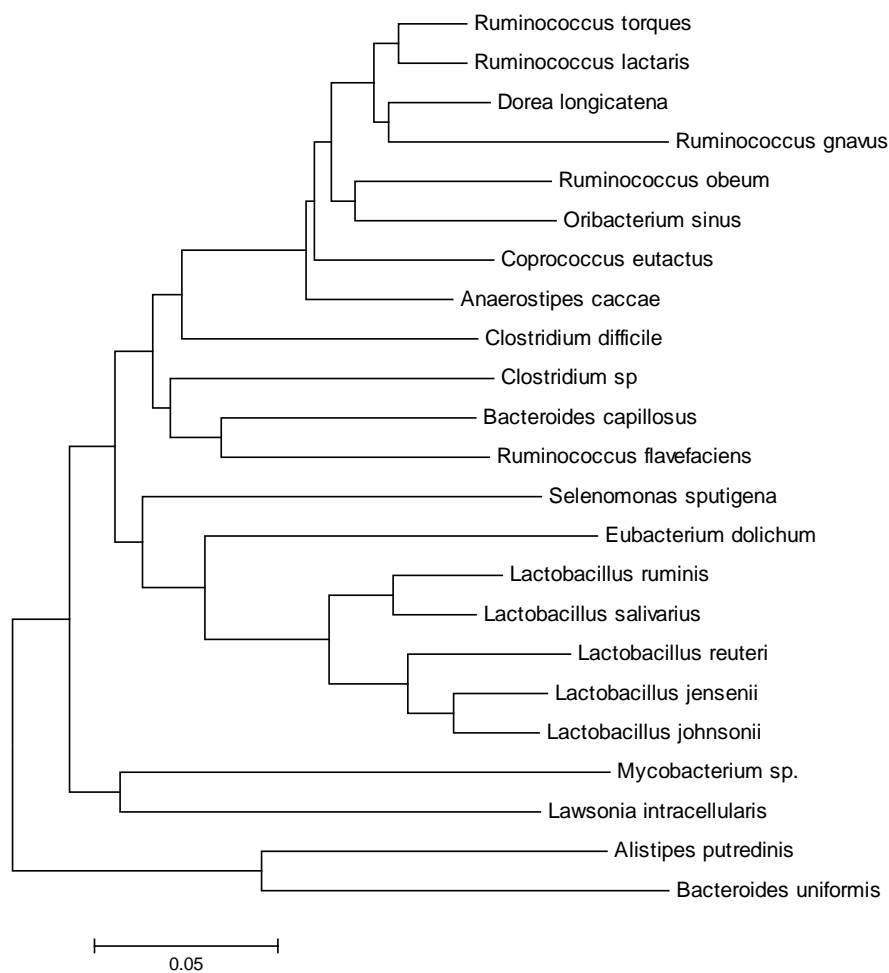
Nella figura 18 è riportato l'albero filogenetico costruito sulle sequenze geniche della flora costituente il microbiota dei topi WT normocalorica. Si possono distinguere una uniforme distribuzione delle specie appartenenti ai due phylum principali costituenti il microbiota, con leggera predominanza dei *Firmicutes*, condizione fisiologica di distribuzione. L'albero è composto da due rami principali rappresentanti i due phylum principali del microbiota. A sua volta il phylum Firmicutes si ramifica ulteriormente nei diversi gruppi di cui è composto. In particolare scorrendo l'albero dall'alto verso il basso si evidenziano i diversi gruppi facenti parte di questo phylum: *Ruminococchi*, *Clostridi* e *Lactobacilli*. Il secondo ramo principale dell'albero invece è rappresentato dal phylum Bacteroidetes.

Figura 18: Rappresentazione filogenetica delle specie batteriche costituenti la flora dei topi WT normocalorica



La rappresentazione filogenetica della flora costituente il microbiota dei topi trattati a dieta WT mostrano una predominanza del phylum *Firmicutes*, rispetto ai Bacteroidetes infatti diversamente da quanto accade per il gruppo a dieta normocalorica, è netta la predominanza del primo rispetto al secondo. Si evidenzia inoltre la presenza di una terza diramazione rappresentante il phylum *Actinobacteria* di cui fa parte il *Mycobacterium sp.* assente nella dieta normocalorica.

Figura 19: Rappresentazione filogenetica delle specie batteriche costituenti la flora dei topi WT VHF



L'albero costruito sulle sequenze dei microrganismi costituenti il microbiota dei topi TLR-/- a dieta normocalorica mostra due ramificazioni generali da cui si dipartono una serie di sottogruppi variamente rappresentati, la presenza delle diverse specie sembra essere molto uniforme rispetto a quello che accade nei topi WT a dieta normocalorica (Fig 19). Nella rappresentazione filogenetica dei topi TLR-/- VHF (Fig. 20) si nota invece, una predominanza del phylum *Firmicutes*, anche se meno marcata rispetto ai WT VHF, ma, a differenza di questi presentano una serie di specie assenti in tutti gli altri gruppi. Nella parte bassa dell'albero infatti si evidenziano specie appartenenti a due phylum caratteristici di questo gruppo : *Verrucomicrobia* e *Lentisphaerae*.

Figura 19: Rappresentazione filogenetica delle specie batteriche costituenti la flora dei topi TLR-/- a dieta normocalorica

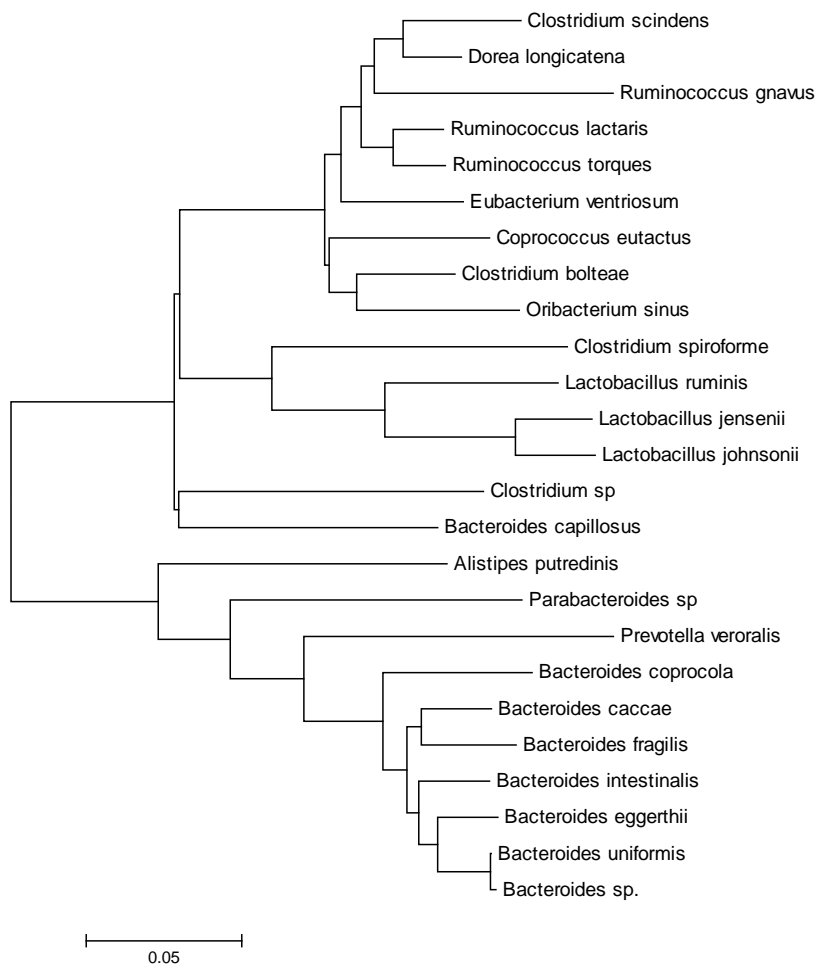
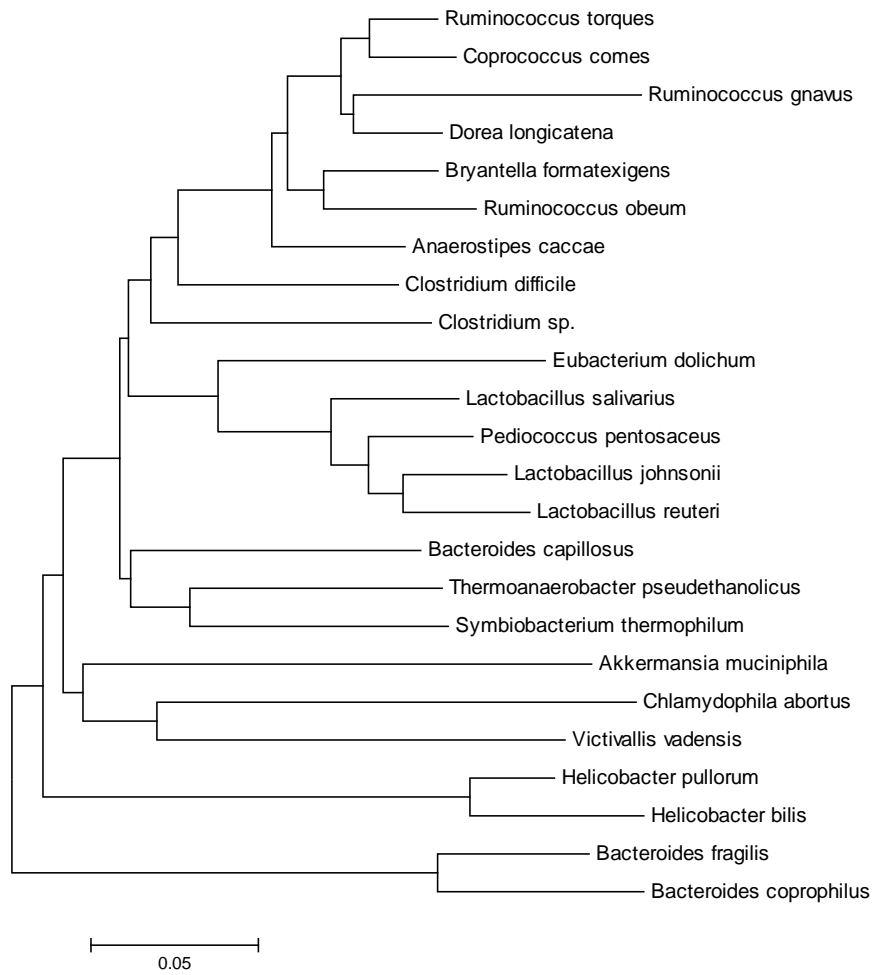


Figura 20: Rappresentazione filogenetica delle specie batteriche costituenti la flora dei topi TLR-/- VHF



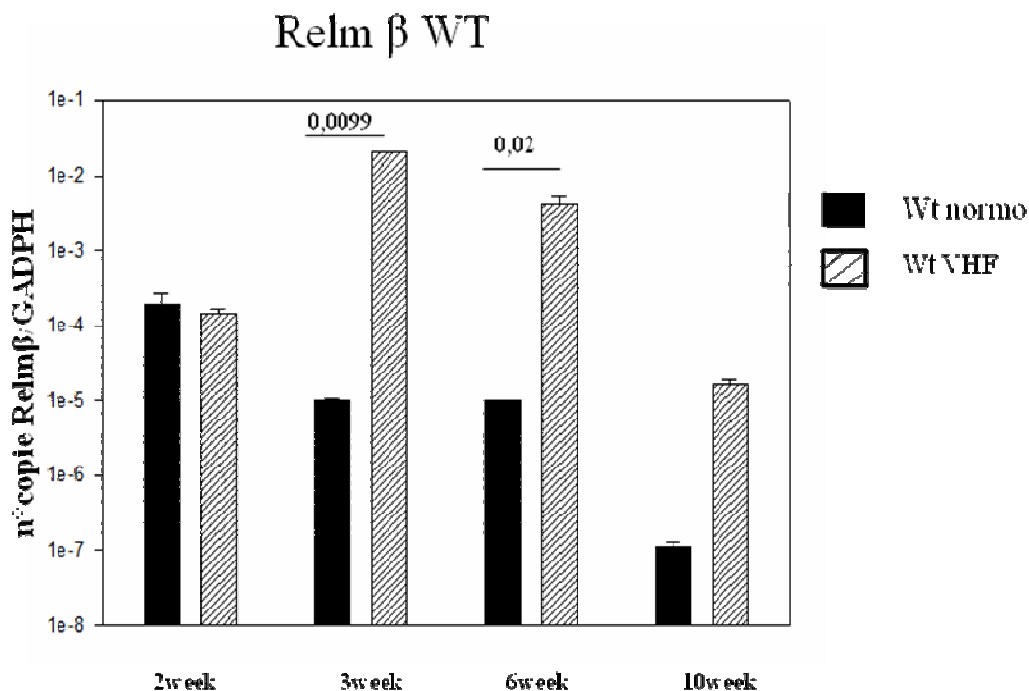
10. Espressione di Resistin like molecole β (RELM β) nell'ileo

Alla luce delle evidenze emerse dall'analisi della flora intestinale dei modelli utilizzati e allo scopo di indagare i meccanismi tramite i quali nel trattamento con dieta ipercalorica avvengono modificazioni marcate sulla composizione della flora stessa, si è valutata l'espressione genica di una proteina prodotta esclusivamente a livello intestinale che sembra essere coinvolta nelle modificazioni del microbiota.

La Resistin-like molecole β è una proteina prodotta dalle goblet cells intestinali. In studi in vivo è stata osservata una relazione diretta tra composizione del microbiota ed espressione della proteina.

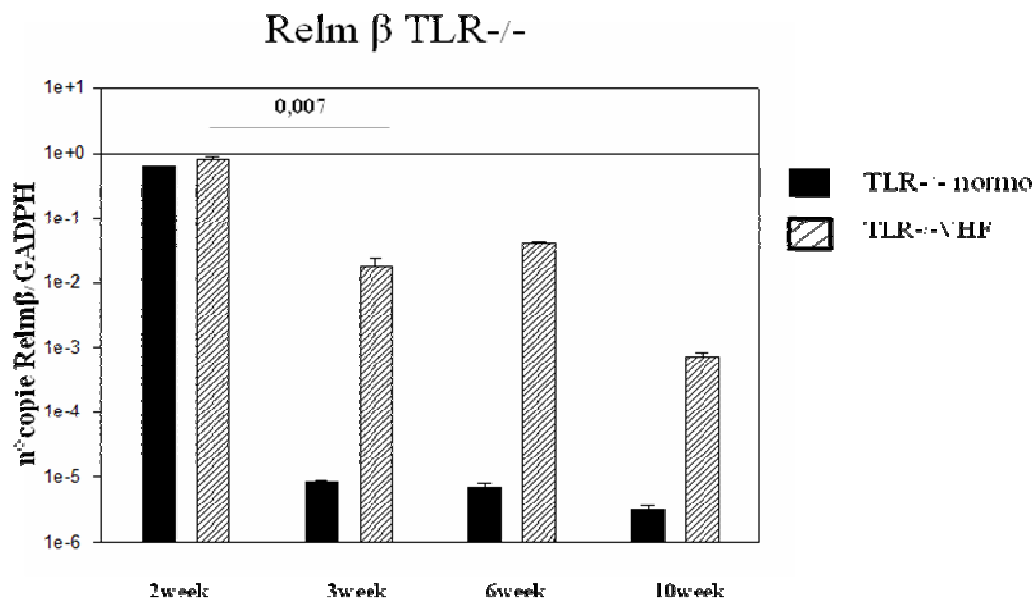
Nella figura 21 sono riportate le valutazioni dell'espressione della proteina effettuate sull'ileo dei topi WT a dieta normocalorica e VHF, espressione valutata alle diverse settimane di dieta. Dal grafico sotto riportato si denota un'aumento dell'espressione della proteina nei topi WT VHF statisticamente significativa a partire dalla terza settimana di dieta, quindi prima che si verifichi il cambiamento della flora intestinale (che avviene alla quarta settimana) e prima che si verifichi l'aumento significativo del peso corporeo (che avviene alla settima settimana di dieta)

Figura 21: Effetto della dieta sulla espressione di Resistin like molecole β nei topi WT



Nella figura 22 sono riportati i dati relativi all'espressione genica di RELM β nell'ileo di topi TLR $^{-/-}$ a dieta normocalorica e VHF alle diverse settimane di trattamento. Contrariamente a quanto accade nei topi WT i livelli di espressione della proteina sembrano diminuire, questo si verifica in maniera statisticamente significativa già dalla terza settimana di dieta ed interessa entrambi i gruppi a dieta normocalorica e VHF anche se nel gruppo a dieta normocalorica risulta più evidente.

Figura 22: Effetto della dieta sulla espressione di Resistin like molecule β nei topi TLR $^{-/-}$

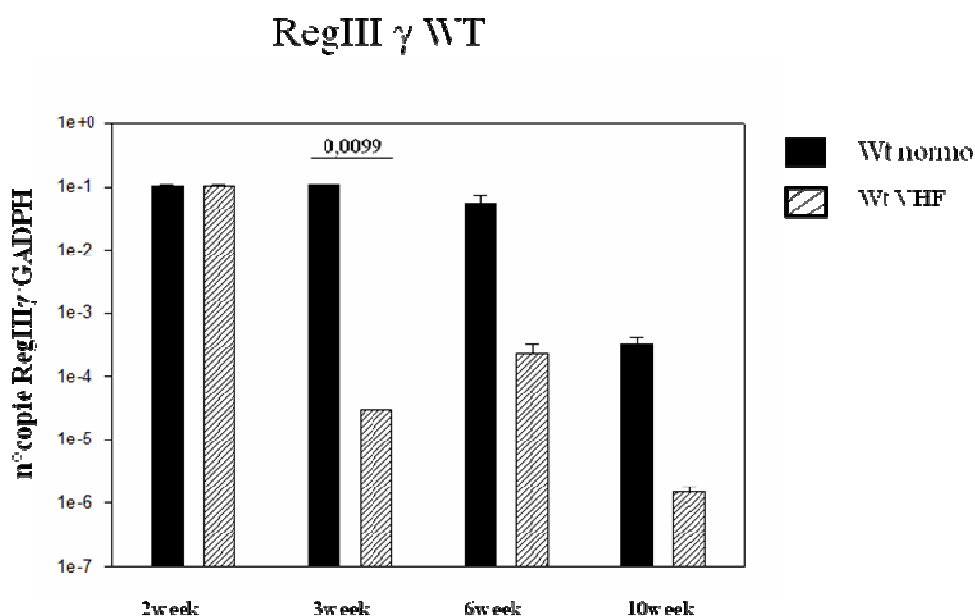


11. Espressione dei livelli di peptidi antimicrobici nell'ileo

A livello intestinale, precisamente nelle cellule del Paneth, vengono prodotti una serie di peptidi antimicrobici che svolgono un ruolo importante nell'omeostasi microbica.

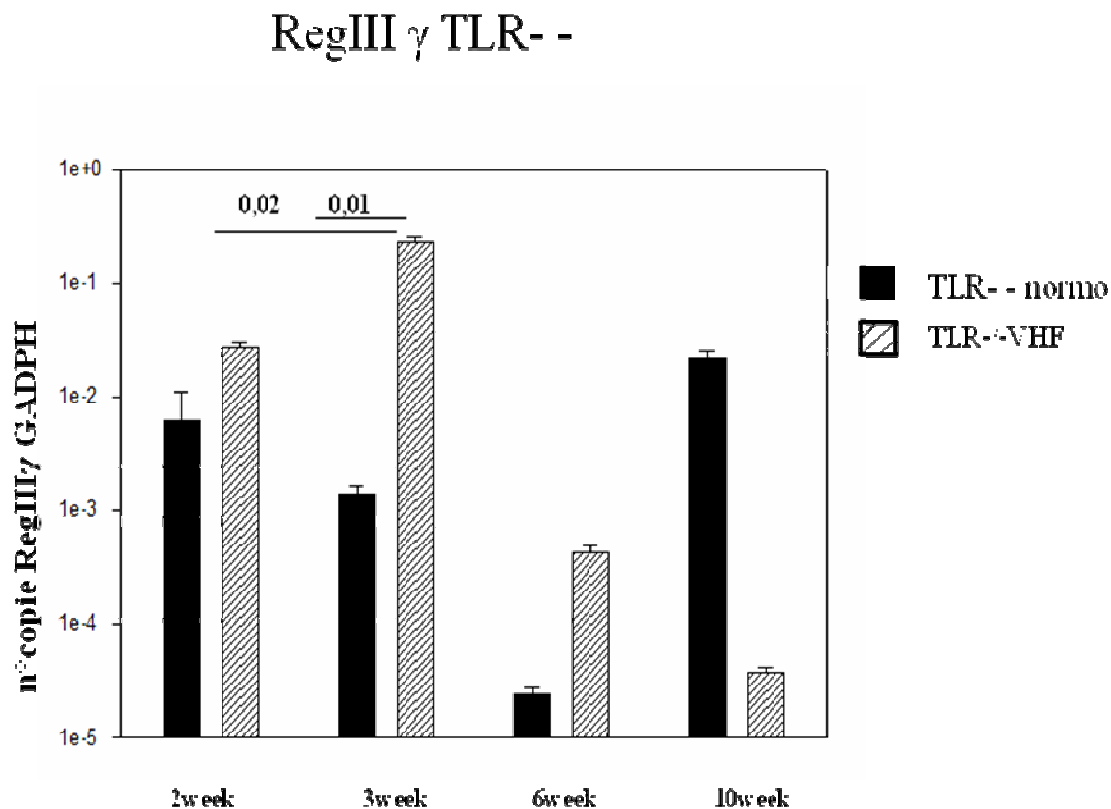
Tra questi peptidi vi sono le defensine, una classe di peptidi antimicrobici cationici caratterizzate da un motivo di sei cisteine che da origine a tre ponti disolfuro, sono classificate in alfa Defensine e beta Defensine, a seconda della posizione dei tre legami disolfuro intramolecolari. Allo scopo di meglio comprendere i meccanismi coinvolti nel cambiamento della flora intestinale è stata valutata l'espressione di alcuni di questi peptidi nell'ileo dei topi in esame. In particolare nella figura 23 è riportata l'espressione di RegIII γ (regenerating protein III), peptide prodotto dalle cellule del Paneth, avente azione antimicrobica ad ampio spettro (sia Gram positivi che negativi). Da quanto emerso dalle valutazioni effettuate nell'ileo dei topi WT a dieta sia normocalorica che VHF, si evince una drastica diminuzione dell'espressione del peptide nell'ileo dei topi VHF rispetto ai topi normo statisticamente significativa già dalla terza settimana, in concomitanza con l'aumento della RELM β .

Figura 23 Effetto del regime dietetico sui livelli di mRNA per RegIII γ nell'ileo di topi WT



Nella figura 24 sono riportati i valori dell'espressione di RegIII γ nell'ileo dei topi TLR-/- sia a dieta normo che VHF alle diverse settimane di trattamento. Contrariamente a quanto si verifica nei topi WT, si evidenzia un aumento dell'espressione del peptide nell'ileo dei topi VHF statisticamente significativo a partire dalla seconda settimana di dieta, fino ad avere un'andamento del tutto opposto alla decima settimana.

Figura 24 Effetto del regime dietetico sui livelli di mRNA per RegIII γ nell'ileo di topi TLR2-/-



Nelle figure 25 e 26 sono riportati i valori dell'espressione genica nell'ileo dei topi WT e TLR-/- a dieta normocalorica e grassa nel tempo di RegIII β , peptide antimicrobico appartenente alla stessa famiglia di RegIII γ ma con azione più marcata nei confronti dei Batteri Gram negativi. Come si evince dalle figure l'andamento è del tutto paragonabile all'andamento dell'espressione di RegIII γ .

Figura 25 Effetto del regime dietetico sui livelli di mRNA per RegIII β nell'ileo di topi

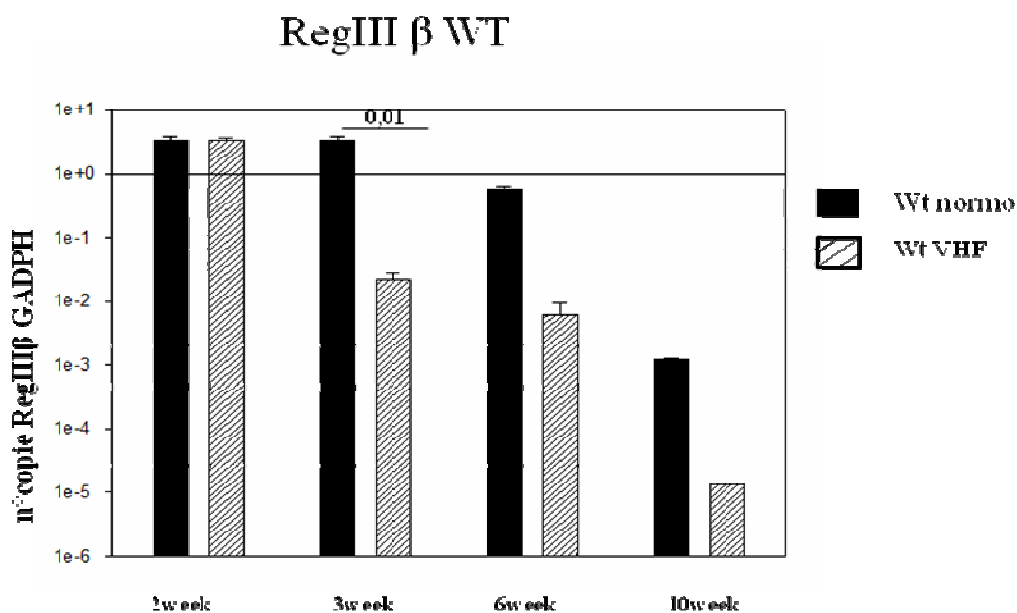
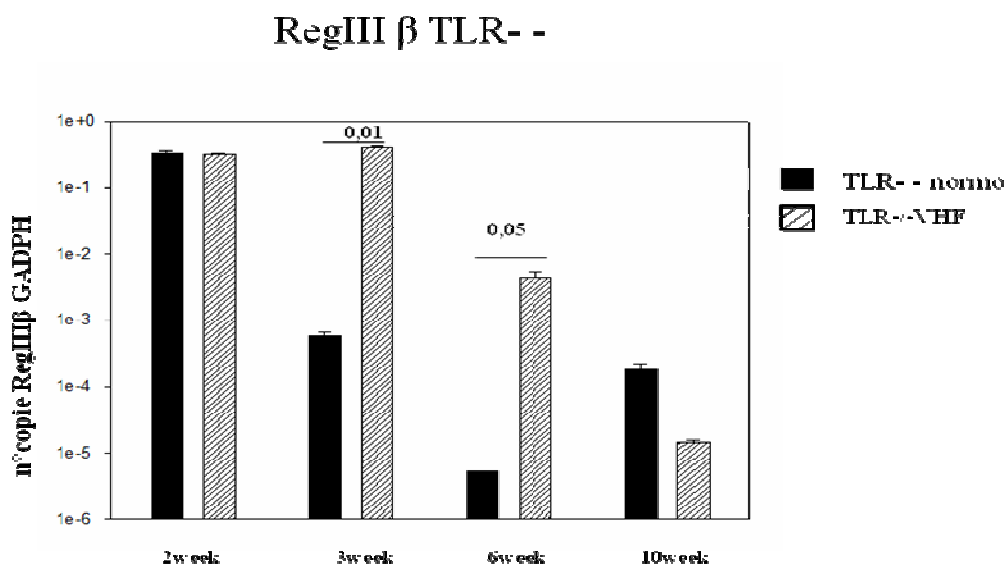


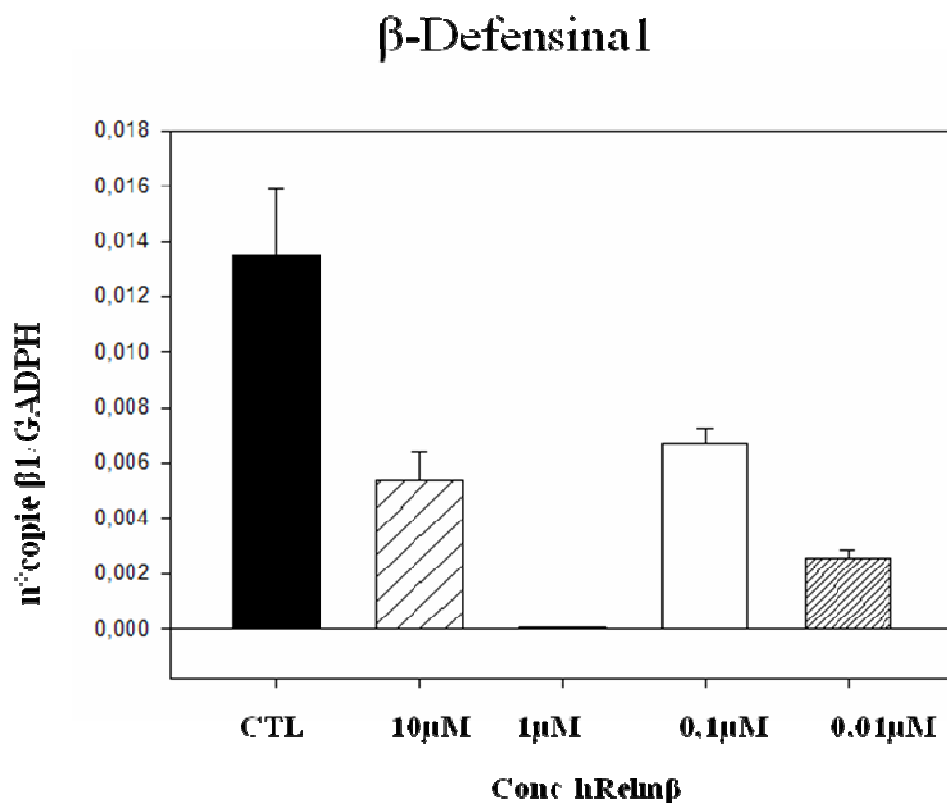
Figura 26 Effetto del regime dietetico sui livelli di mRNA per RegIII β nell'ileo di topi TLR2-/-



12. Effetto della stimolazione di Relm β sull'espressione delle defensine in un modello di cellule intestinali umane (CaCo2)

Alla luce di quanto emerso dalle valutazioni effettuate nell'ileo dei topi in esame, si è voluta verificare la possibile relazione tra la Resistin Like Molecule β e l'espressione di peptidi antimicrobici. A questo scopo sono state utilizzate cellule CaCo2, queste sono state stimolate con la proteina ricombinante umana hRELM β a diverse concentrazioni ed è stata valutata l'espressione di alcuni peptidi antimicrobici. Dalla figura 25 si evince un marcato effetto down-regolatorio della hRELM β sull'espressione dell'mRNA codificante la β -defensina, particolarmente evidente alla concentrazione di 0,01 μ M ($p < 0,03$).

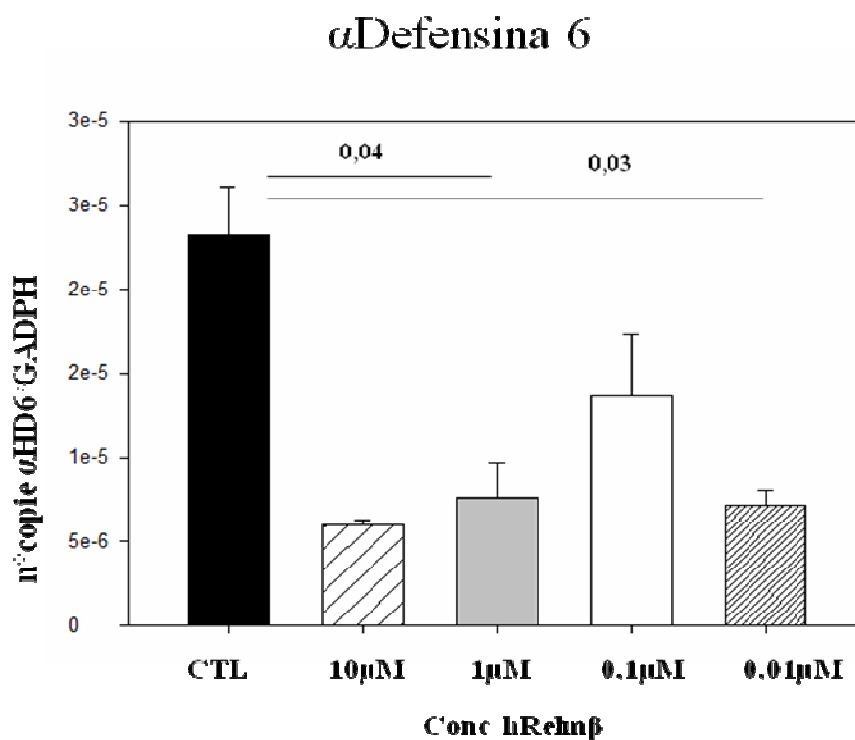
Figura 25 Effetto di hRELM β sui livelli di β Defensina 1 mRNA in cellule CaCo2



Nella figura 26 è riportata l'espressione della α Defensina6 in seguito a stimolazione con hRELM β . anche in questo caso si verifica una sotto regolazione dell'espressione del peptide, effetto statisticamente significativo alla concentrazione più bassa di stimolazione.

Questi dati confermano l'ipotesi di una possibile azione diretta di RELM β sull'espressione dei peptidi antimicrobici prodotti a livello intestinale.

Figura 26 Effetto di hRELM β sui livelli di α Defensina 6 in cellule CaCo2 stimolate con hRELM β

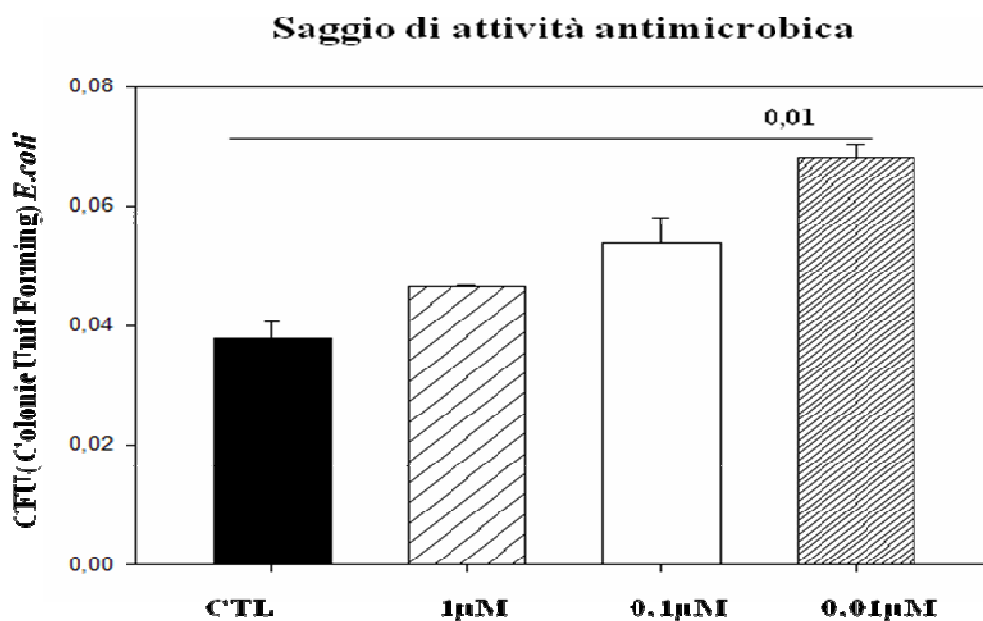


13. Saggio di attività antimicrobica su surnatante di CaCo2 stimulate con hRELMβ

Allo scopo di confermare la diminuita produzione dalle cellule CaCo2 stimulate con hRELMβ dei peptidi antimicrobici nel surnatante cellulare è stato effettuato un saggio di attività antimicrobica utilizzando come ceppo batterico l'*E.coli*.

Da quanto emerso dalla determinazione del saggio, le Colonie Unit Forming (CFU) di *E.coli* derivanti dall'incubazione dei batteri con il surnatante delle cellule stimulate con 0,01μM di h RELM risultano aumentate in maniera statisticamente significativa, dimostrando che la down regolazione dei livelli di mRNA codificante per le defensine si traduce in una ridotta produzione dei peptidi antimicrobici.

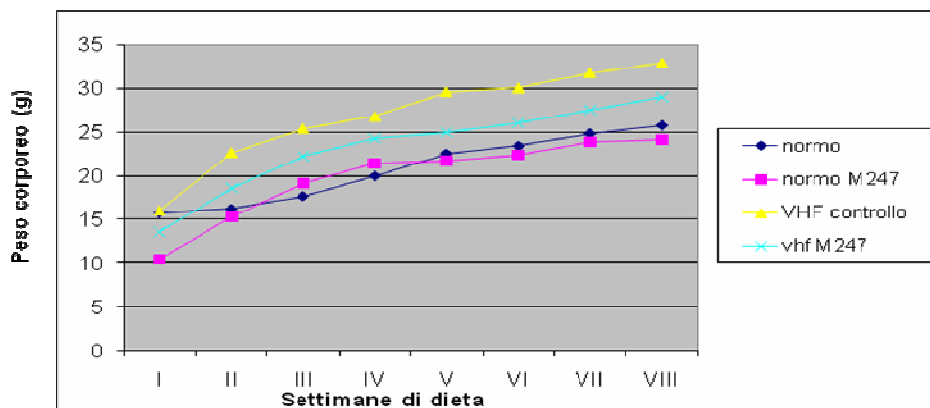
Figura 27 CFU di *E.coli* dopo incubazione con surnatante cellulare



14. Effetto della supplementazione dietetica con *Lactobacillus crispatus* M247 sull'andamento del peso corporeo

Per meglio valutare il ruolo della flora intestinale nell'obesità topi C57BL/6J maschi allocati a ricevere una dieta iperlipidica (VHF) con una supplementazione giornaliera di *Lactobacillus crispatus* M247. Nella figura 28 e 29 è riportato l'effetto della supplementazione con *L.crispatus* M247 sull'incremento ponderale causato dalla dieta normocalorica o ipercalorica. La somministrazione del probiotico per 10 settimane a topi a dieta normocalorica non influenza il progressivo, fisiologico incremento ponderale. Al contrario la somministrazione del probiotico a topi a dieta VHF riduce in maniera significativa l'incremento ponderale causato da questa tipologia di dieta ($p < 0,05$).

Figura 28 Andamento del peso corporeo in topi WT normo e VHF supplementari con *Lactobacillus crispatus* M247.



15 Effetto della supplementazione con *L.crispatus* M247 sull'introito calorico e sul peso del tessuto adiposo totale

Durante le dieci settimane di trattamento sono state monitorate il consumo di cibo agli animali per valutare l'*energy intake* (le calorie assunte). Come mostrato in figura 29, i topi con dieta normocalorica e iperlipidica supplementati con il ceppo probiotico, mostrano un introito calorico giornaliero paragonabile contrariamente a quanto accade nei topi senza supplementazione dove i topi VHF presentano un *energy intake* più elevato rispetto ai topi tenuti a dieta normocalorica. In altre parole la supplementazione con *L crispatus* M247 completamente previene l'aumento di *energy intake* giornaliero associato alla dieta VHF.

Inoltre la supplementazione dietetica con *L crispatus* M247 a topi a dieta VHF completamente inibisce l'accumulo di grasso corporeo associato a questo regime dietetico (figura 30).

Figura 29 Effetto della supplementazione con *Lactobacillus crispatus* M247 sull'introito energetico giornaliero in topi WT a dieta normocalorica e VHF.

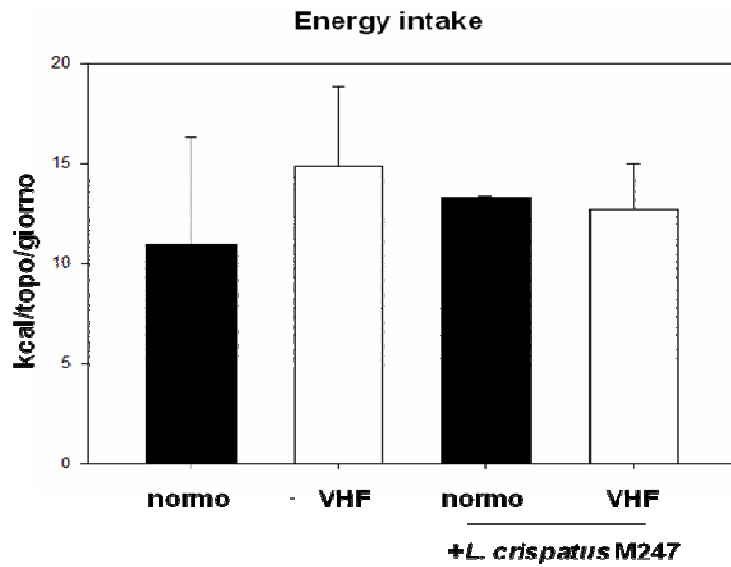
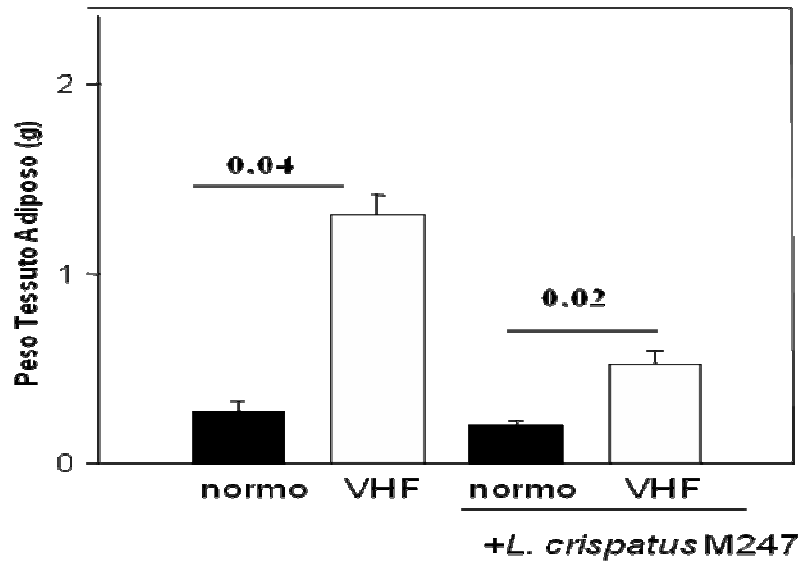


Figura 30 Effetto della supplementazione con *Lactobacillus crispatus* M247 sul tessuto adiposo totale in topi WT a dieta normocalorica e VHF.

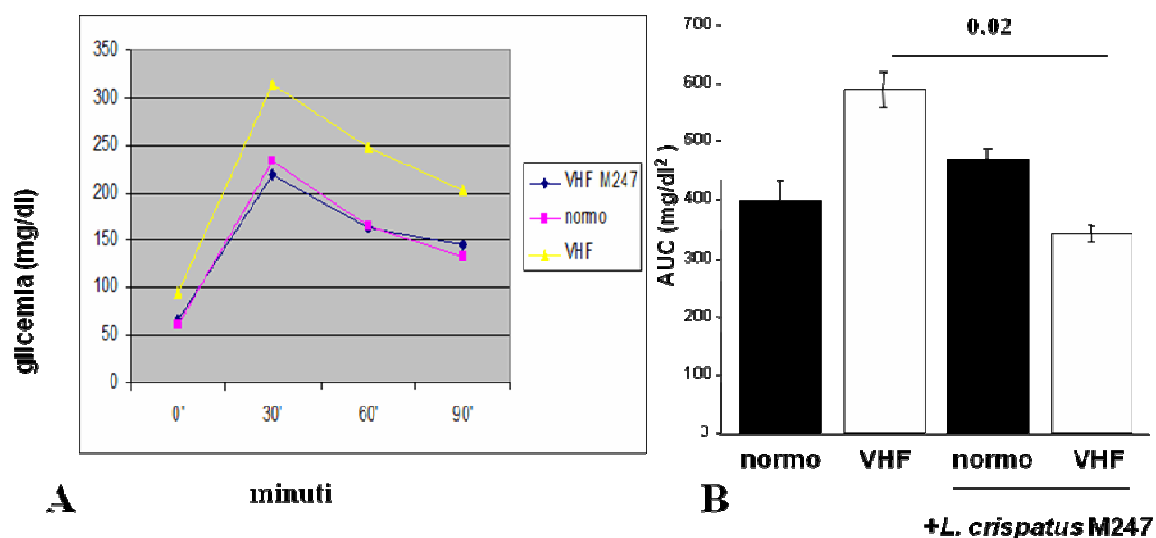


16 Effetto della supplementazione dietetica di *L.crispatus* M247 sulla tolleranza al glucosio

La somministrazione del ceppo probiotico nei topi WT a dieta normocalorica non causa alcun effetto sulla tolleranza al glucosio, come evidenziato dal fisiologico andamento della curva da carico di glucosio (figura 31). La somministrazione di *L. crispatus* M247 a topi WT che hanno ricevuto per 10 settimane la dieta VHF, invece, comporta un sensibile miglioramento della tolleranza al glucosio. In tali animali, infatti, dopo l'iniziale innalzamento della glicemia, la concentrazione di glucosio nel sangue ritorna prontamente a valori prossimi a quelli iniziali. (Fig 31 A).

Il dato è confermato anche dal calcolo dell'area sottesa alla curva glicemica, dove si osserva una riduzione dell'area sottesa statisticamente significativa nei topi WT a dieta VHF e supplementati con il ceppo probiotico (Fig. 31 B).

Figura 31 Test di tolleranza al glucosio: A) andamento della glicemia in topi WT a dieta normocalorica e VHF con supplementazione giornaliera di *L.crispatus* M247. B) valori dell'AUC

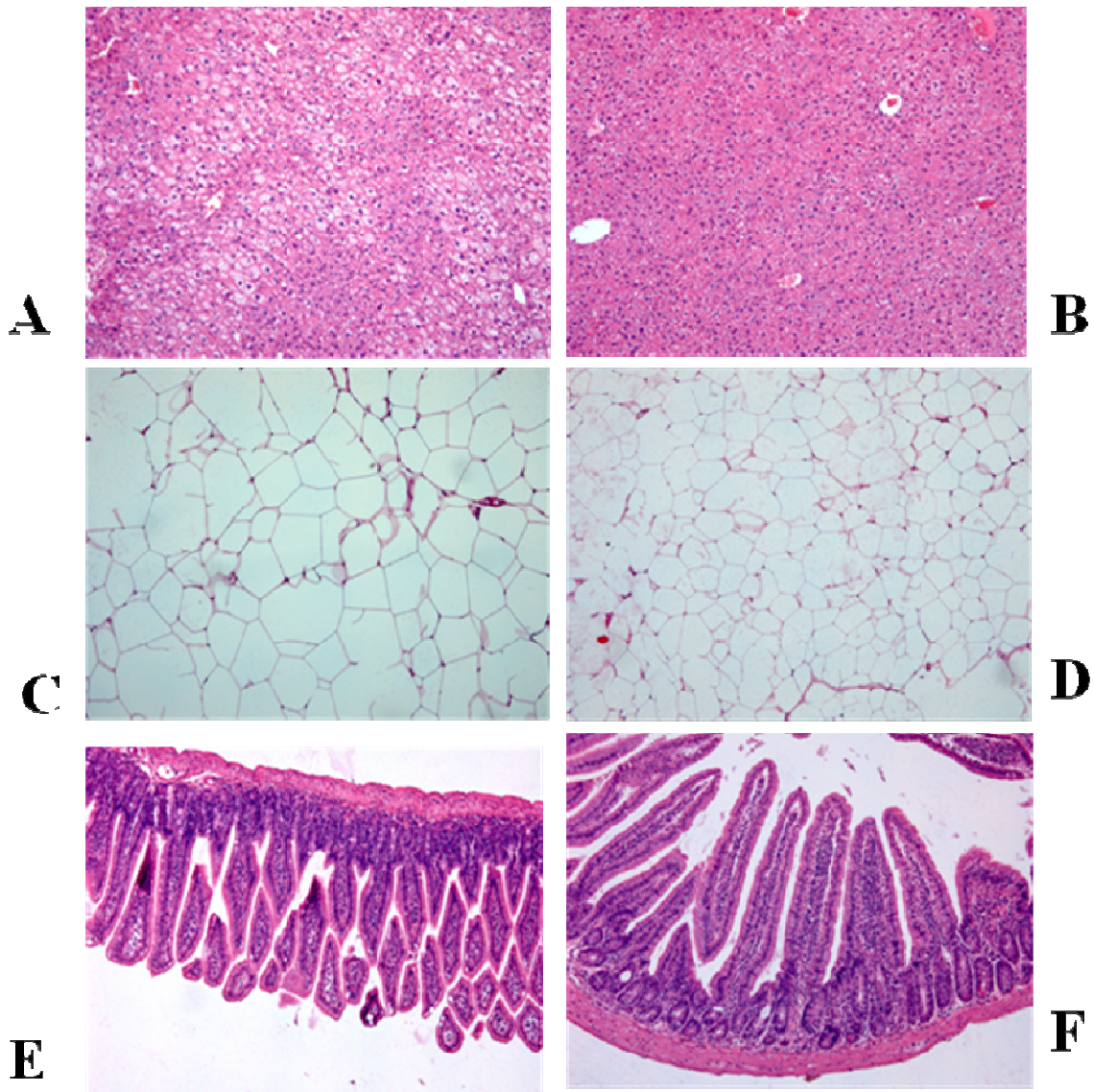


17 Effetto della supplementazione dietetica con *L.crispatus* M247 sulla steatosi epatica, sul parenchima adiposo e sulla mucosa ileale.

Abbiamo quindi verificato l'effetto della supplementazione dietetica con un ceppo probiotico sulla severità della steatosi epatica e sull'accumulo di tessuto adiposo nell'organismo. Come riportato in figura 32 B, la supplementazione dietetica con *L. crispatus* M247 ha ridotto significativamente la steatosi epatica nei topi a dieta VHF. Negli animali a dieta VHF che hanno ricevuto *L. crispatus* M247, sono presenti, infatti, meno depositi lipidici negli epatociti a paragone dei topi WT a dieta VHF (Fig 32 A).

Inoltre la supplementazione con il probiotico nei topi a dieta VHF ha ridotto l'iperplasia del tessuto adiposo che si verifica a seguito della dieta (Fig 32 C e D). Gli adipociti dei topi supplementari con M247 risultano, infatti, di dimensioni ridotte. Al contrario, la supplementazione con probiotico (Fig 32 F) non ha alterato la morfologia dei villi intestinali.

Figura 32: A) Analisi istologica sezione di fegato di topi WT VHF; B) fegato di topi WT VHF supplementari con *L.crispatus*M247. C) Analisi istologica di una sezione di tessuto adiposo di topi WT VHF; D) tessuto adiposo di topi WT VHF supplementari con *L.crispatus*.M247; E) Analisi istologica di una sezione ileale di topi WT VHF; F) Sezione ileale di topi WT VHF supplementari con *L.crispatus* M247.

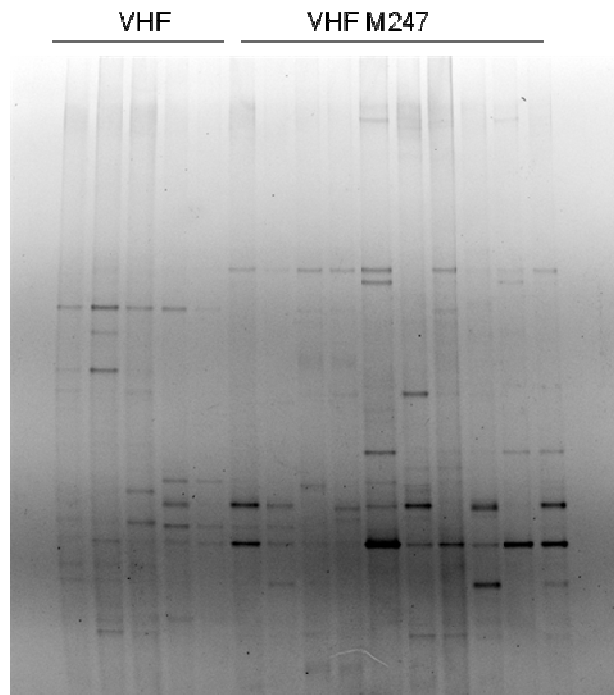


18 .Effetto della supplementazione dietetica con *Lactobacillus crispatus* M247 sulla modificazione della flora intestinale indotta dalla dieta VHF.

Alla luce di quanto emerso dalle valutazioni biologiche e metaboliche dei topi a dieta VHF supplementati con *L .crispatus* M 247, si è analizzato l'effetto del probiotico sulle alterazioni della flora intestinale causate dalla dieta VHF.

Le valutazioni sono state effettuate amplificando la regione 16S ribosomiale dei due principali phylum batterici presenti a livello intestinale (*Firmicutes* e *Bacteroides*) e del gruppo dei *Lactobacillus*. Nella figura 33 è riportata la DGGE effettuata con gli amplificati della regione 16 S ribosomiale dei *Firmicutes* (primer L-U). I profili mostrano che nei topi che hanno ricevuto la supplementazione di probiotico nel corso dell'esperimento si realizza una minore diversificazione delle specie microbiche rispetto ai topi a dieta VHF, dove le modificazioni del microbiota appaiono risultano molti evidenti a partire dalla quarta settimana di dieta. Specie come i *Clostridium*, che caratterizzano la flora dei topi alla sesta settimana di dieta, nei topi a cui è stato somministrato il probiotico non sembrano essere presenti in maniera predominante rispetto alle altre specie. Il gruppo dei *Lattobacillus* è costantemente presente nell'arco del periodo di trattamento, diversamente da quanto accade nei topi WT VHF dove si osserva una notevole diminuzione delle specie appartenenti a questo gruppo. In sintesi la supplementazione dietetica con *L .crispatus* M247 sembra limitare le modificazioni della flora intestinale osservata nei topi WT a dieta VHF.

Figura 33:DGGE sul DNA fecale di topi WT VHF con e senza supplementazione con *L.crispatus* effettuata con primer universali L-U



19. Effetto della supplementazione dietetica di *L.crispatus* sull'espressione ileale di RELM β e peptidi antimicrobici

Oltre ai già citati effetti sulla modificazione del microbiota Relm β agisce anche sull'assorbimento del glucosio a livello intestinale regolandone direttamente il trasporto attraverso la regolazione dei meccanismi di trasporto nella cellula, aumentando la traslocazione a livello della membrana del trasportatore per il glucosio GLUT2. A livello epatico alti livelli di Relm β inducono insulino-resistenza, la proteina agisce sopprimendo i segnali indotti dalla stimolazione dell'insulina negli epatociti: studi *in vitro* condotti su epatociti stimolati con Relm β hanno mostrato una riduzione della espressione di IRS1 e IRS2 (insulin receptor substrate, IRS), substrati del recettore dell'insulina (IR) attivati in seguito alla fosforilazione del recettore stesso.

Alla luce dell'effetto esplicito dalla supplementazione dietetica del probiotico *L. crispatus* M247 nei topi WT a dieta VHF, (aumento della tolleranza al glucosio, diminuzione della steatosi epatica, riduzione delle alterazioni della flora intestinale), si è valutata l'effetto della supplementazione con *L. crispatus* M247 sull'espressione di Relm β nell'ileo di topi WT a dieta VHF.(Fig 34). La supplementazione con *L.crispatus* M247 causa una riduzione dei livelli di mRNA per Relm β nell'ileo dei topi WT che hanno ricevuto una dieta VHF. Quest'effetto potrebbe in parte spiegare la miglior tollerabilità al glucosio che si osserva nei topi WT VHF, in quanto è noto dalla letteratura come

elevati livelli di Relm β (come si verifica nei topi WT a dieta VHF senza trattamento) inducano insulino-resistenza a livello epatico.

Nella figura 35, sono riportati i livelli di mRNA di due peptidi antimicrobici (RegIII β e RegIII γ) nell'ileo dei topi WT a dieta VHF con e senza trattamento con probiotico. A seguito della somministrazione del probiotico si nota un aumento dei livelli di mRNA codificante per i peptidi antimicrobici statisticamente significativa se paragonata ai livelli riscontrati nei topi a dieta VHF senza trattamento ($p < 0,05$ per RegIII γ , $p = 0,0099$ per RegIII β). Questi dati, seppur parziali, possono in parte spiegare la minor diversificazione della flora microbica che si verifica nei topi WT a dieta VHF supplementari con *Lactobacillus crispatus* M247.

Figura 34 Effetto della supplementazione con *L. crispatus* M24 sull'espressione di Relm β nei topi WT a dieta VHF

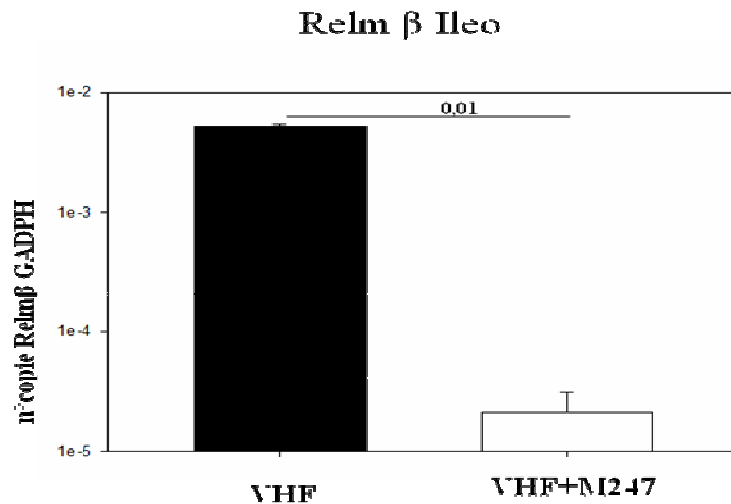
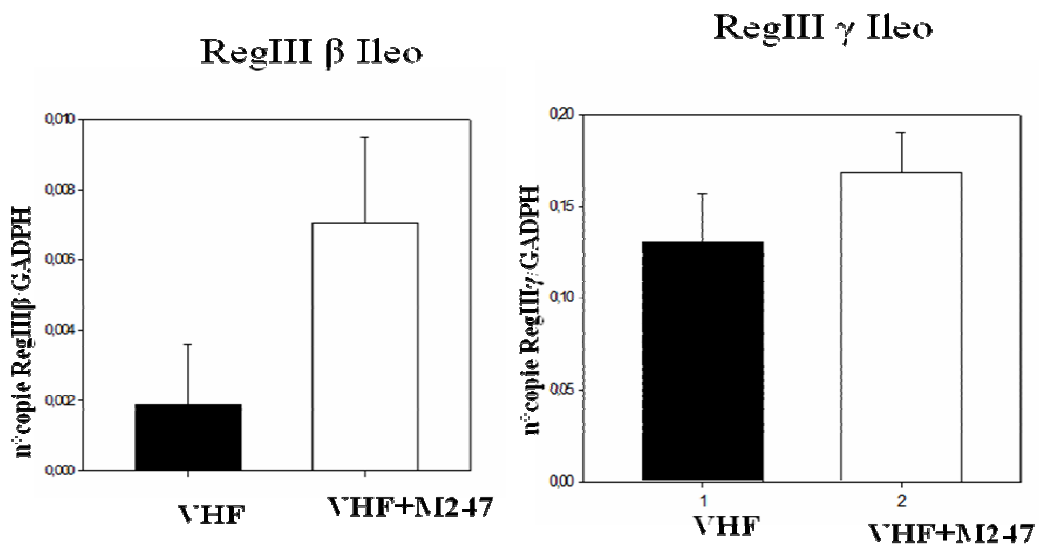


Figura 35: Effetto della supplementazione con *L. crispatus* M24 sull'espressione di RegIII γ e RegIII β nell'ileo di topi WT a dieta VHF

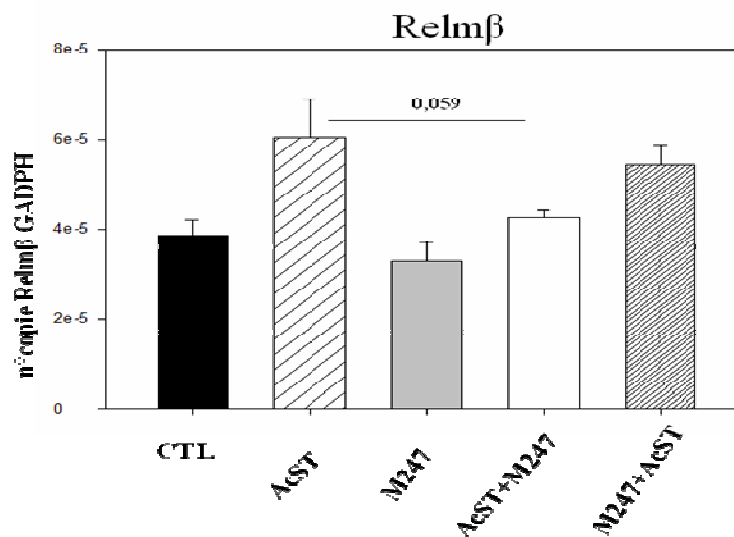


20. Effetto del *Lactobacillus crispatus* M247 sull'espressione di Relm β indotta da Acido Stearico in cellule intestinali umane (CaCo2)

Per chiarire l'effetto *in vivo* della supplementazione del *Lactobacillus crispatus* M247 sulla modulazione dell'espressione di Relm β , è stato allestito un modello *in vitro* di cellule epiteliali intestinali umane, le CaCo2

Nelle cellule è stato determinato l'effetto del *L. crispatus* M247 sull'espressione di Relm β indotta dall'Acido Stearico. Come evidente nella figura 36 l'acido stearico determina un significativo aumento dell'mRNA di Relm β , tuttavia la presenza di *Lactobacillus crispatus* M247 significativamente riduce questo effetto.

Figura 36: Espressione di Relm β in cellule CaCo2 non stimolate, stimolate con Acido Stearico, *L. crispatus* M247, e con entrambi in diversa esecuzione temporale.



21. Effetto del *Lactobacillus crispatus* M247 sull'espressione di peptidi antimicrobici indotta in un modello di cellule intestinali umane (CaCo2)

Nelle figure 37 e 38 sono riportati i valori dell'espressione di due peptidi antimicrobici: la β Defensina 1 e la α Defensina6. L'espressione dei peptidi è diminuita in maniera statisticamente significativa a seguito della stimolazione con Acido Stearico, tuttavia la presenza del *L. crispatus* M247 attenua la diminuzione dell'espressione di tali peptidi indotta dall'Acido Stearico.

Figura 37: Espressione della β Defensina 1 in CaCo2 stimolate con *Lactobacillus crispatus* M247

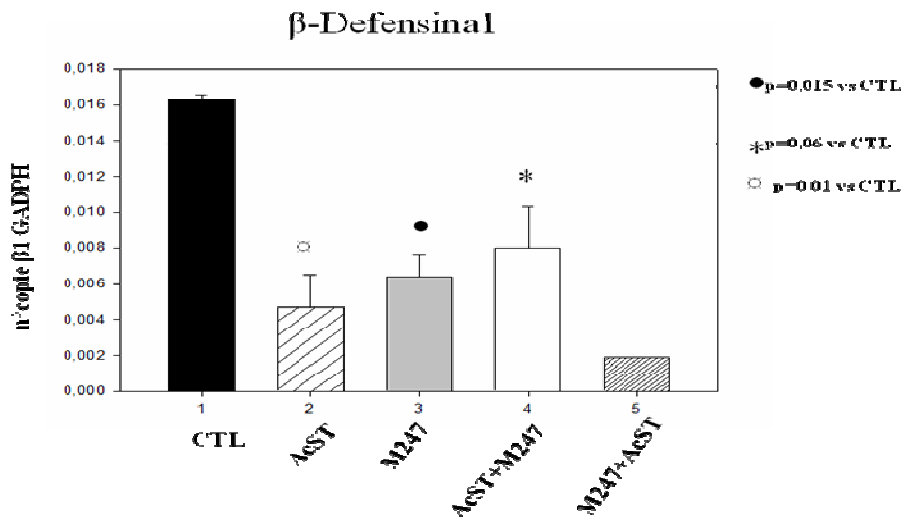
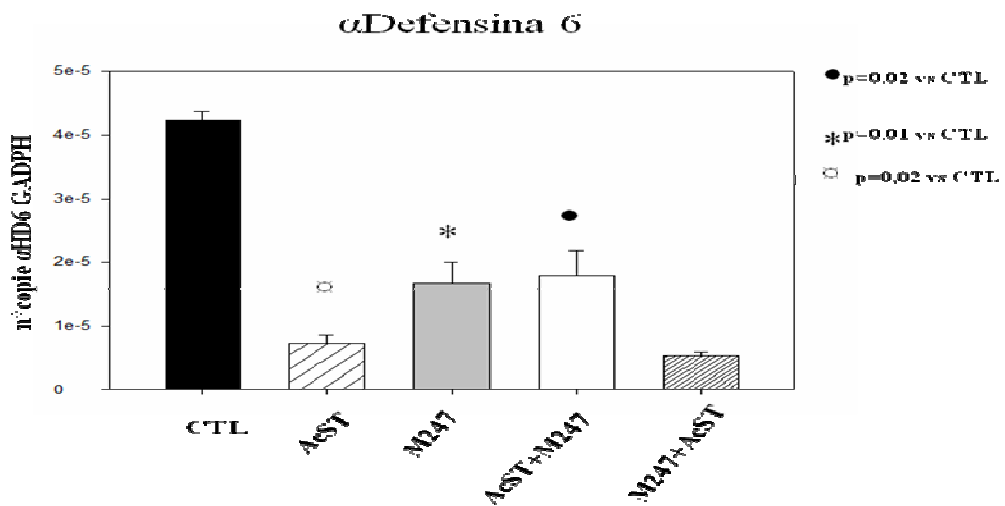


Figura 38: Espressione della α Defensina 6 in CaCo2 stimolate con *Lactobacillus crispatus* M247



DISCUSSIONE

Secondo dati riportati nel 2009 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità l'obesità interessa circa 300 milioni di persone in tutto il mondo, ma la sua diffusione è in costante aumento non solo tra la popolazione adulta, ma anche negli adolescenti e nei bambini. Tali considerazioni assumono particolare importanza considerando che l'obesità può essere considerata una vera e propria patologia, essa infatti è caratterizzata da livelli circolanti di citochine pro-infiammatorie costantemente elevati e dall'associazione con patologie croniche infiammatorie, quali la steatosi epatica, l'aterosclerosi, patologie cardiache ed anche alcune forme di neoplasie. (Das et al 2001). L'insorgenza dell'obesità è il risultato di diverse concause: fattori ereditari, dieta ipercalorica, carenza di esercizio fisico, disordini endocrini, alterazioni della flora batterica intestinale.

Il microbiota colico rappresenta una complessa popolazione dinamica di microrganismi la cui composizione è influenzata da diversi fattori quali le condizioni fisio-patologiche dell'individuo, lo stato immuologico, la motilità intestinale, le secrezioni, il tipo di dieta. Nel soggetto adulto il microbiota colico comprende due diverse divisioni principali: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Negli ultimi anni una serie di lavori sperimentali hanno fatto seguito all'intuizione di Elia Metchnikoff che per primo sostenne che la flora microbica intestinale possa influenzare varie attività dell'ospite, eventualmente aumentandone le aspettative di vita. A tutt'oggi è stato dimostrato che la flora batterica intestinale svolge un'azione benefica per l'organismo contribuendo alla fermentazione dei polisaccaridi indigeribili della dieta, alla produzione di vitamine e modulando il sistema immunitario mucosale.

Negli ultimi anni l'attenzione di molti gruppi di ricerca si è focalizzata sul ruolo svolto dal microbiota intestinale nell'obesità, numerosi sono, infatti, i lavori che hanno per oggetto la caratterizzazione della flora intestinale in corso questa patologia, tali studi hanno rilevato la predominanza, nei soggetti obesi, di specie appartenenti alla famiglia dei *Firmicutes* rispetto a specie appartenenti alla famiglia dei *Bacteroidetes*. (Gordon et al 2004). Sono stati ipotizzati diversi meccanismi attraverso i quali la composizione della flora influenzerebbe l'introito calorico. Ad esempio, la flora batterica è in grado di produrre molte idrolasi che si occupano della digestione dei polisaccaridi complessi derivanti dalla dieta: questi vengono trasformati in monosaccaridi e acidi grassi a corta catena (SCFA) che rappresentano una importante riserva di energia per l'organismo (Backhed F et al 2005). Un secondo meccanismo riguarda l'espressione di un inibitore della lipoproteina lipasi (LPL), il Fasting-induced adipose factor (FIAF), prodotta dall'intestino, dal fegato e dal tessuto adiposo. L'aumento dei livelli di LPL porta ad un'aumentato assorbimento

cellulare di acidi grassi dai triacilgliceroli associati alle lipoproteine e l'accumulo di trigliceridi negli adipociti. (Gordon et al 2006).

Questo studio si è inizialmente proposto di investigare il rapporto esistente tra obesità e composizione del microbiota attraverso un'analisi dettagliata della composizione del microbiota in un modello murino di obesità non genetica, in secondo tempo di individuare i meccanismi attraverso i quali il microbiota è modificato in caso di dieta ipercalorica ed in ultima analisi, come la "manipolazione" della microflora intestinale attraverso un microrganismo probiotico, influenzi lo stabilirsi delle complicanze dell'obesità.

A questo scopo sono stati allestiti modelli murini di obesità non genetica, ossia topi WT C57BL/6J e topi B6.129-TLR2tm1kir/J, ceppo di topi deficienti per il gene Tlr2, sottoposti ad una dieta iperlipidica (Very High Fat diet –VHF), confrontati con topi WT C57BL/6J e un gruppo di topi B6.129-TLR2tm1kir/J a cui, invece, è stata somministrata una dieta standard.

Il protocollo sperimentale ha previsto un periodo di trattamento di dieci settimane durante le quali il peso corporeo ed il cibo somministrato è stato monitorato settimanalmente, mentre a diversi tempi durante l'esperimento sono stati prelevati dei campioni fecali per la caratterizzazione del microbiota. In un secondo momento è stato allestito un modello sperimentale di obesità non genetica a cui è stato somministrato un microrganismo probiotico, il *Lactobacillus crispatus* M247. I dati raccolti nel corso di questi esperimenti hanno evidenziato un incremento del peso corporeo nei topi C57BL/6J posti a dieta VHF statisticamente più elevato a partire della settima settimana di dieta ($p=0.05$) rispetto allo stesso ceppo di animali posti invece a dieta standard. Il dato più interessante tuttavia deriva dallo studio dell'andamento del peso corporeo dei topi C57BL/6J deficienti del TLR2. Questi animali tenuti a dieta grassa rivelano un'incremento di peso corporeo precoce rispetto allo stesso ceppo di topi posti a dieta standard ($p=0.05$ a due settimane di dieta). Infine dal confronto del peso corporeo dei topi C57BL/6J wild-type e C57BL/6J TLR2-/- a dieta VHF emerge che quest'ultimo ceppo presenta un'incremento del peso corporeo statisticamente più elevato rispetto al primo ceppo ($p=0,02$ a 10 settimane di dieta). Il calcolo dell'introito calorico non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra topi WT e TLR2-/- a dieta VHF. La somministrazione di *Lactobacillus crispatus* M247 a topi WT per dieci settimane a dieta standard non induce alcuna variazione del peso corporeo mentre la somministrazione del probiotico nei topi WT a dieta grassa riduce l'incremento di peso corporeo associato alla dieta.

I test di tolleranza al glucosio sono stati eseguiti sui tre modelli sperimentali descritti in precedenza a dieci settimane dall'inizio della dieta. Dopo 30 minuti dalla somministrazione del carico di glucosio i livelli glicemici nei topi WT a dieta standard presentano un iniziale fisiologico incremento che tuttavia ritorna a valori prossimi a quelli iniziali dopo 120 minuti, dimostrando che

in questi animali i sistemi di controllo glicemico, quali la secrezione di insulina, risultano normali. Il test eseguito in topi WT a dieta grassa invece permette di evidenziare un maggiore incremento della glicemia dopo 30 minuti dalla somministrazione dello zucchero, glicemia che non ritorna nella norma dopo 120 minuti, evidenziando quindi una incapacità di tollerare il glucosio somministrato. Nei topi TLR2^{-/-}, le determinazioni glicemiche effettuate a 10 settimane di dieta evidenziano che in questi animali indipendentemente dalla dieta la curva da carico di glucosio risulta pressoché normale, con un aumento della glicemia a 30 minuti che tuttavia tende subito a raggiungere i valori di partenza. Infine, la somministrazione di *Lactobacillus crispatus* M247 a topi WT a dieta grassa comporta un miglioramento della tolleranza al glucosio. In tali animali, infatti, dopo l'iniziale innalzamento glicemico, la glicemia ritorna prontamente a valori prossimi a quelli iniziali, in maniera del tutto diversa rispetto a quanto occorre nei topi WT tenuti a dieta grassa ma senza la somministrazione del probiotico.

La composizione del microbiota è stata analizzata attraverso la determinazione dei microrganismi presenti all'interno dei campioni fecali raccolti dai ceppi murini utilizzati nelle diverse condizioni sperimentali prima descritte. I campioni sono stati raccolti a diversi tempi allo scopo di meglio caratterizzarne l'andamento nel tempo. Dai campioni è stato estratto il DNA batterico, questi è stato sottoposto a PCR qualitativa tramite l'utilizzo di tre coppie di primers amplificanti la regione 16S ribosomiale delle principali divisioni batteriche presenti nell'intestino, i *Firmicutes* ed *Bacteroidetes*, e i primers amplificanti per i *Lactobacillus*. Gli amplificati così ottenuti sono stati sottoposti ad una corsa elettroforetica su gradiente di gel denaturante (DGGE) allo scopo di suddividere i frammenti di DNA, amplificati tramite PCR, in base a variazioni nella composizione nucleotidica. I frammenti così separati e visualizzati alla luce UV sono stati rimossi dal gel, il DNA presente è stato eluito dallo stesso e sottoposto a sequenziamento genico per la caratterizzazione dei microrganismi presenti nei campioni analizzati. Dall'analisi così svolta sul modello WT a dieta normocalorica o grassa si evince che le variazioni nella composizione della microflora intestinale si evidenziano dopo quattro settimane di trattamento, tali variazioni precedono quindi l'incremento di peso dei topi trattati con dieta grassa rispetto ai normo. La biodiversità, intesa come diversificazione dei profili microbici, è sempre maggiore nei topi WT rispetto ai TLR2^{-/-}. Per alcuni gruppi batterici, es *i Ruminococcus*, la somministrazione della dieta grassa non condiziona la presenza di questi gruppi a livello fecale, ma ne influenza il rapporto tra le specie. Nei topi trattati con dieta grassa è rilevante la comparsa di *Eubacterium bifforme* e *Dorea Longicatena*. Nei topi TLR2^{-/-} l'effetto della dieta grassa è meno evidente (impatto minore sul microbiota rispetto ai WT). Dall'analisi filogenetica dei microrganismi trovati nei campioni fecali e dall'analisi quantitativa svolta sugli stessi si evince, in sintesi, un cambiamento nella composizione del microbiota, nei topi a dieta

grassa si verifica una predominanza di microrganismi della famiglia dei *Firmicutes*, ciò si evidenzia in maniera meno evidente nel modello dei topi TLR2-/- dove, l'analisi filogenetica e quantitativa confermano un cambiamento meno evidente nel trattamento a dieta grassa rispetto al trattamento a dieta standard. Nel modello con il trattamento con il probiotico, si verifica un cambiamento nella flora intestinale, in particolare nel modello a dieta ipercalorica, dove si verifica una maggior presenza di microrganismi della famiglia dei *Lactobacillus*, in particolare si denota la presenza di *Lactobacillus salivaris* e *Lactobacillus jensenii*. La flora intestinale del modello WT-VHF con somministrazione di *Lactobacillus crispatus* M247 ha evidenziato cambiamenti della flora dovuta alla dieta VHF meno evidente, la flora è più diversa e specie come i clostridi sono meno preponderanti rispetto al modello senza trattamento con il probiotico.

Lo studio sistematico della flora intestinale in animali sottoposti a diversi regimi dietetici ha evidenziato, per la prima volta, come la modificazione delle specie microbiche presenti nelle feci dei topi ai quali è somministrata una dieta ipercalorica precede temporalmente l'aumento di peso negli stessi (le modificazioni tra le specie si verifica già a partire dalla quarta settimana di dieta, l'aumento di peso nei topi a dieta VHF diventa statisticamente significativo alla settima settimana di dieta). Difatti, tutti gli studi precedenti avevano esaminato la flora in animali/individui nei quali il fenotipo obeso era già stabilito. Un aspetto che tuttavia andrebbe chiarito è se altri regimi dietetici ipercalorici (ad esempio diete ricche in zuccheri) ed associate allo sviluppo di un fenotipo obeso sono associate con una analoga modificazione della microflora intestinale.

Queste valutazioni ci hanno suggerito di investigare possibili meccanismi che inducono la modificazione della flora microbica a seguito della dieta. Le defensine sono una classe di peptidi antimicrobici cationici caratterizzate da un motivo di sei cisteine che da origine a tre ponti disolfuro, sono classificate in alfa Defensine e beta Defensine, secondo la posizione dei tre legami disolfuro intramolecolari. Le alfa Defensine sono prodotte dalle cellule del Paneth, nelle cripte del piccolo intestino, queste sono sovraespresse in patologie infiammatorie del colon (Park et al 2004-Salzman et al 2002). Le beta Defensine sono sintetizzate da diversi tipi di cellule epiteliali (della pelle, tratto respiratorio, intestino e nel tratto gastrointestinale) (Purjia et al 2004). Esse svolgono un'azione antimicrobica ad ampio spettro, interessando sia batteri Gram-positivi che Gram-negativi. Tra i meccanismi regolatori dell'espressione di questi peptidi vi è la via dei Toll-like receptor. Numerosi studi hanno infatti evidenziato un legame diretto tra attivazione dei recettori dell'immunità innata e aumentata produzione di questi peptidi a livello intestinale (Brandt et.al 2007, Vaishnav et al.2008). Uno studio pubblicato su Nature nel 2009 da Salzman e collaboratori, dimostra come ci sia un legame diretto tra espressione di peptidi antimicrobici e modificazione del microbiota intestinale. Queste evidenze hanno suggerito un possibile legame tra l'espressione di questi peptidi endogeni e

la modificazione del microbiota che abbiamo osservato nei nostri modelli. Valutazioni di espressione genica nell'intestino distale di topi C57BL/6J trattati a dieta standard e VHF hanno evidenziato come nei secondi ci sia una diminuzione significativa di peptidi antimicrobici (sia α che β Defensine), tale diminuzione si verifica già a partire dalla terza settimana di dieta e persiste per tutta la durata del trattamento. La mancanza del recettore del TLR2 nei topi tenuti a dieta normocalorica determina, come atteso, una diminuzione della produzione di peptidi antimicrobici, che può spiegare la minore biodiversità del microbiota di questi animali e le ridotte modificazioni che si osservano nei topi TLR2^{-/-} mantenuti a dieta ipercalorica. Infine, a seguito della somministrazione di *Lactobacillus crispatus* M247, l'espressione di defensine risulta aumentata rispetto ai topi a sola dieta VHF, suggerendo che il probiotico stimola la produzione di questi fattori antimicrobici.

La Resistin_{like} Molecule Beta è una proteina prodotta esclusivamente a livello intestinale, dalle goblet cells. La RELM beta agisce sull'assorbimento del glucosio modulandone il trasporto attraverso la regolazione dei meccanismi di assorbimento a livello della membrana cellulare (GLUT 2 glucose transporter) (Krimi et al 2009). Recenti studi hanno evidenziato un'elevata espressione di questa proteina in modelli murini di obesità genetica (topi db/db) e in modelli murini di obesità non genetica (topi trattati con una dieta ipercalorica) (Shojima et al 2005, Fujio et al 2008). Inoltre, è stata osservata una relazione diretta tra composizione del microbiota ed espressione della proteina, in topi RELMbeta KO infatti, si osserva una prevalente presenza di microrganismi appartenenti alla famiglia dei *Firmicutes* rispetto ai *Bacteroidetes* (Hildebrandt et al. 2009). Queste evidenze in letteratura hanno suggerito un possibile coinvolgimento di questa proteina nelle modificazioni del microbiota nei modelli utilizzati in questo studio. Infatti l'mRNA codificante questa proteina nell'ileo di topi trattati con dieta VHF è notevolmente aumentato già a partire dalla seconda settimana di dieta, aumento che risulta assente nei topi tenuti a dieta VHF e trattati con il *Lactobacillus crispatus* M247.

Il ruolo fisiologico della RELMbeta, nonostante siano note le sue azioni a livello intestinale, non è stato ancora ben definito. L'azione svolta su due fronti, effetto sul microbiota ed sull'omeostasi energetica intestinale, suggerisce un suo possibile ruolo nel legame tra dieta e modificazione del microbiota intestinale. A questo scopo, è stata ipotizzata una possibile azione diretta svolta da questa proteina a livello intestinale sulla produzione di peptidi antimicrobici endogeni. A questo scopo è stato allestito un modello in vitro di cellule CaCo2 (Colonic Epithelial Cells) sottoposte a stimolazione con la proteina ricombinante hRELMbeta ed è stata valutata l'espressione dei peptidi antimicrobici. Questi esperimenti hanno dimostrato che RELMbeta riduce l'espressione della β Defensina 1, riducendo significativamente l'attività antimicrobica del surnatante cellulare. Peraltro,

l'espressione di Relm β indotta con Acido Stearico è inibita in maniera significativa dal trattamento con *L. crispatus* M247, indicando quindi che l'effetto della supplementazione dietetica con questo probiotico potrebbe essere dovuto alla riduzione della secrezione di RELMbeta e dei suoi effetti sulle defensine.

In conclusione del lavoro svolto e dalle evidenze sperimentali riportate in questo lavoro di dottorato si evince un importante ruolo svolto dalla flora intestinale nell'obesità. Il cambiamento della flora precede lo stabilirsi del fenotipo "obeso" e quindi probabilmente contribuisce al suo sviluppo. Inoltre, la dieta iperlipidica svolge un ruolo chiave nella modificazione del microbiota attraverso la stimolazione della produzione di Relm β e della conseguente inibizione dell'espressione di peptidi antimicrobici prodotti a livello intestinale, favorendo la predominanza del phylum *Firmicutes* rispetto al phylum *Bacteroidetes*. La somministrazione di un ceppo probiotico limita le modificazioni della flora intestinale, influenzando la secrezione di Relm β , e soprattutto limita la severità delle complicanze metaboliche dell'obesità.

BIBLIOGRAFIA

- **Taylor JJ, Flaa RC.** (1964), Histochemical analysis of Paneth cell granules in rats. *Arch Pathol.*;77:278–285
- **Acheson DWK, Luccioli S.** (2004) : Mucosal immune responses. *Best Pratics & Reserch Clinical Gastroenterology.* **18**:387-404.
- **Artis D, Wang ML, Keilbaugh SA, He W, Brenes M, Swain GP, Knight PA, Donaldson DD, Lazar MA, Miller HR, Schad GA, Scott P, and Wu GD** (2004):RELM/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune effectormolecule in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:13596–13600.
- **Bergogne –Berezin E.** (2000).Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea. *Int J Antimicrob Agents.***16**: 521-6.
- **Bevins CL.** (2004)The Paneth cell and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol.*;20:572–580.
- **Bouchard C.** (1997) **Obesity in adulthood--the importance of childhood and parental obesity.** *N Engl J Med.* **337**:926-7
- **Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, Elli M, Brun P, Cavaggioni A, Tormen D, Sturniolo GC, Morelli L, Palù G.** (2005): Beneficial effect of auto-aggregating Lactobacillus crispatus on experimentally induced colitis in mice. *Immunol. Med. Microbiol.* **43**: 197-204.
- **Cremonini F, Di Caro.** (2002) Meta-analysis: effect of prebiotic on administration on antibiotic-associated diarrhea. *Aliment Pharmacol Ther.* **16**:1461-7.
- **D'Souza AL, Rajkumar C.** (2002): Probiotics in prevention of associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ.* **324**: 1361-6.
- **Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L.** (2003): Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology?. Best practice & research. *Clinical Gastroenterology.* **17**: 711-724.

- **Francini-Prsenti F, Brocadello F, Beltramolli D, Nardi M, Caregato L.** (2008) : Sugar cane policosanol failed to lower plasma cholesterol in primitive, diet-resistant hypercholesterolaemia : a double blind, controlled study. *Complementary therapies in medicine* **16**: 61-65.
- **Ganz T, Weiss J.** (1997) Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Cell Mol Life Sci*; **59**:156–170.
- **Guarino A, Berni Canani R.** (1995): Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*: **20**:333-8.
- **Guarino A, Bruzzese E.** (2001): I probiotici: indicazioni cliniche certe e potenziali meccanismi d'azione. *Prospettive in pediatria*. **31**:309-20.
- **He W, Wang ML, Jiang HQ, Stepan CM, Shin ME, Thurnheer MC, Cebra JJ, Lazar MA, and Wu GD.** (2003): Bacterial colonization leads to the colonic secretion of RELM α /FIZZ2, a novel goblet cell-specific protein. *Gastroenterology* **125**: 1388–1397.
- **Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T.** (1993) Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol*.; **11**:105–128.
- **Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G.**(2002): Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection. *Aliment Pharmacol Ther*. **16**:167-80.
- **Medzhitov R.** (2001) : Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews Immunology*, **1**: 135-145.
- **Muyzer G, de Wall EC, Uitterlinden AG** (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain-reaction-amplified genes coding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. **59**: 695-700.
- **Nair MG, Guild KJ, Du Y,** (2008): Goblet cell-derived resistin-like molecule β augments CD4⁺ T cell production of INF γ and infection-induced intestinal inflammation . *J Immunol* **181**:4709-4715.

- **Ouellette AJ, Bevins CL.** (2001);Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm Bowel Dis.* **7**:43–50.
- **Ouellette AJ, Hsieh MM, Nosek MT.,** (1994)Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect Immun.*;**62**:5040–5047
- **Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E** (2002).: Probiotics:an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**:279-89.
- **Pelto L, Isolauri E, Lilius EM, Nuutila J, Salminen S. .**(**1998**) : Probiotic bacteria down-regulate the milk –induced inflammatory response in milk-ipersensitivity subject but have an immunostimulatory effect in healthy subjects *Clin. Exp. Allergy.* **28**: 1474-9.
- **Perdigon G, De Maciñas ME, Alvarez S, Olivier G, De Ruiz Holgado AP.** (1986): Effect of perorally administred lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* **53**: 404-10.
- **Perdigon G, De Maciñas ME, Alvarez S, Olivier G, De Ruiz Holgado AP** (1998): Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immun.*; **63**: 17-23.
- **Podolsky DK.** (2002).: Inflammatory Bowel Disease. *N Engl. J Med.* **347**: 417-29. *Semin Hematol.*;**34**:343–354
- **Porter EM, Bevins CL, Ghosh D** (2002)., The multifaceted Paneth cell’s defensins from human neutrophils. *J Clin Invest.*;**84**:2017–2020.
- **Selzman HM, Liebelt RA.** (1961) A cytochemical analysis of Paneth cell secretion in the mouse. *Anat Rec.* **140**:17–22.
- **Shanahan F.** (2004) : Probiotics in inflammatory bowel disease- therapic rationale and role. *Adv Drug Deliv Rev.* **56**: 809-18.
- **Shojima N, Ogihara T, Inukai K.** 2005: Serum concentration of resistin like molecule β and γ are elevated in high fat fed and obese db/db mice, with increased production in the intestinal tract and bone marrow. *Diabetologia* **48**: 984-992.

- **Suerbaum S, Michetti P.** (2002): Helicobacter pylori infection. *N Engl J Med.*: **347**: 1175-86.

- **Surawicz CM, Elmer GW.**(1989): Prevention of antibiotic associated diarrhoea by Saccharomyces Boulardii. *Gastroenterology.* **96**: 981-88.

- **Sutas Y, Soppi E, Korhonen H.** (1996): Suppression of lymphocytes proliferation in vitro by bovine caseins hydrolyzed with Lactobacillus casei GG-derived enzymes. *Scand J Immunol.* **98**:216-24.

- **Tannok GW, Murno K, Hamnsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK.** (2000): Analysis of the fecal microflora of human subject consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2578-2588.

- **Ulrich N.** (1996): Sequence Heterogeneities of gene encoding 16S rRnas in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol.* **178**: 5636-5643.

- **Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, Matteuzzi D, Campieri M.** (1999): Impact on the composition of the fecal flora by a new probiotic preparation : preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* **13**: 1103-8.

- **Voltan S, Castagliuolo I, Elli M, Longo S, Brun P, Porzionato A, Macchi V, Palu G, Sturniolo GC, Morelli L, Martines D.** (2007): Aggregating phenotype in Lactobacillus crispatus determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clinical and vaccine immunology.* **14**: 1138-1148

- **Walsh JH, Peterson WL.** 1995: The treatment of Helicobacter pylori infection in the management of peptic ulcer disease. *N Engl J Med.*:**333**: 984-91.

- **Wehkamp J, Chu H, Shen B,** (2006) Paneth cell antimicrobial peptides: topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. *FEBS Lett.*;**580**:5344–5350.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Castagliuolo per avermi supportata, incoraggiata ed aiutata durante questo mio percorso ed il Dr.Martines per avermi seguita mettendomi a disposizione le sue conoscenze durante gli anni di questo Dottorato.