

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE FARMACEUTICHE APPLICATE

TESI DI LAUREA

Valutazione *in vitro* dell'effetto di una combinazione di probiotici e composti naturali sul mantenimento dell'integrità della barriera intestinale.

RELATORE: Prof.ssa Monica Montopoli

CORRELATORE: Dott. Mattia Tinazzi

LAUREANDA:

Fontana Martina

Matricola: 1230911

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

ABBREVIAZIONI:

5-ASA: Acido 5-aminosalicilico

Abs: Absorbance

ADA: Adalimumab

AJ: *Adherens junctions*

bTJ: *Bicellular tight junctions*

CD: Morbo di Crohn

CrV: Crystal Violet

CS: Corticosteroidi orali

CSs: Recettore dei glucocorticoidi

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: Acido deossiribonucleico

EIM: Extra-intestinal manifestations

FBS: *Fetal bovine serum*

HBSS: *Hank's balanced salt solution*

IBD: *Inflammatory bowel disease*

IFX: Infliximab

IL: Interleuchina

INF- γ : Interferone- γ

JAM: *Junction adhesion molecule*

LPS: Lipopolisaccaride

PBS: *Phosphate buffered saline*

Pen/Strep: Penicillina/streptomicina

PFA: Paraformaldeide

PSC: Colangite sclerosante primitiva

SASP: Sulfasalazina

SEM: Errore standard medio

SP: Sulfapiridina

siRNA: Short interfering RNA

TEV: Venous thromboembolism

TJ: *Tight junctions*

TNF- α : *Tumor necrosis factor α*

tTJ: *Tricellular tight junctions*

UC: *Colite ulcerosa*

ZO: *Zonula occludens*

SOMMARIO:

1.INTRODUZIONE	2
1.1 EPITELIO INTESTINALE E PATOLOGIE INFIAMMATORIE ASSOCIATE	2
1.1.1 FISILOGIA DELL'EPITELIO INTESTINALE.....	2
1.1.2 COMPLESSI GIUNZIONALI.....	4
1.1.2.1 STRUTTURA E FUNZIONE DELL'OCCLUDINA	4
1.1.2.2 STRUTTURA E FUNZIONE DELLE CLAUDINE	4
1.1.2.3 JUNCTION ADHESION MOLECULE (JAM).....	4
1.1.2.4 STRUTTURA E FUNZIONE DELLA TRICELLULINA.....	5
1.1.3 MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI.....	6
1.1.3.1 IL MORBO DI CROHN (CD)	7
1.1.3.2 LA COLITE ULCEROSA (CU).....	7
1.1.3.3 MANIFESTAZIONI EXTRAINTESTINALI (EIM)	9
1.2 TRATTAMENTI TRADIZIONALI E INNOVATIVI PER IBD	11
1.2.1 TRATTAMENTI TRADIZIONALI PER IBD	11
1.2.1.1 AMINOSALICILATI NELLA REMISSIONE DELLE IBD	11
1.2.1.2 LA TERAPIA ANTI-TNF- α PER LA REMISSIONE DI IBD	12
1.2.1.3 CORTICOSTEROIDI ORALI PER IL TRATTAMENTO DI IBD	12
1.2.1.4 EFFICACIA E SICUREZZA DEI TRATTAMENTI TRADIZIONALI PER IBD	13
1.2.2 TRATTAMENTI INNOVATIVI PER IBD	13
1.2.2.1 TRATTAMENTI INNOVATIVI PER IL MIGLIORAMENTO DELLA MICROECOLOGIA INTESTINALE	13
2. OBIETTIVI	16
3. MATERIALI E METODI.....	18
3.1 COLTURE CELLULARI	18
3.2 TEST DI VITALITA' CELLULARE.....	19
3.3 IMMUNOFLUORESCENZA	20
3.4 ANALISI STATISTICA	21
4. RISULTATI	22
4.1 SAGGI DI VITALITA' CELLULARE	22
4.2 IMMUNOFLUORESCENZA	23
4.2.1 EFFETTO DEGLI STIMOLI INFIAMMATORI TNF- α /IFN- γ E LPS.	23
4.2.2 EFFETTO DEL PROBIOTICO SULLA MORFOLOGIA DI OCCLUDINA	24
4.2.3 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL PROBIOTICO IN PRESENZA DI STIMOLI INFIAMMATORI	24
5.DISCUSSIONE	26

6.BIBLIOGRAFIA..... 28

1.INTRODUZIONE

1.1 EPITELIO INTESTINALE E PATOLOGIE INFIAMMATORIE ASSOCIATE

1.1.1 FISILOGIA DELL'EPITELIO INTESTINALE

L'intestino riveste un ruolo fondamentale nell'assorbimento di sostanze, nutrienti, e per la difesa da eventuali agenti patogeni esterni all'organismo. L'intestino tenue è un organo che presenta una lunghezza media dai 3 ai 5 metri, e si divide in duodeno, digiuno e ileo (Fig.1). Il duodeno è la sezione più corta, misura in media dai 20 cm ai 25 cm di lunghezza: la sua estremità prossimale è collegata al piloro, mentre l'estremità distale si fonde con l'inizio del digiuno, il quale risulta lungo circa 2,5 metri e contiene pliche circolari (lembi muscolari) e villi per assorbire i prodotti della digestione. L'ileo è invece la porzione finale dell'intestino tenue, misura circa 3 metri e termina nel cieco: assorbe tutti i nutrienti finali, come la vitamina B12, gli acidi della bile ed eventuali prodotti non assorbiti dal digiuno.¹

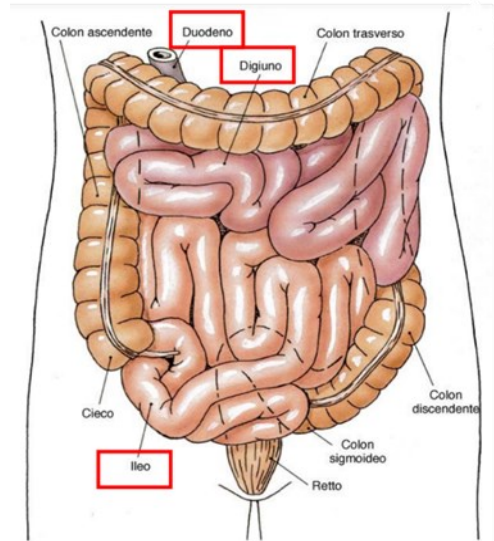


Figura 1. Struttura anatomica dell'intestino tenue.¹

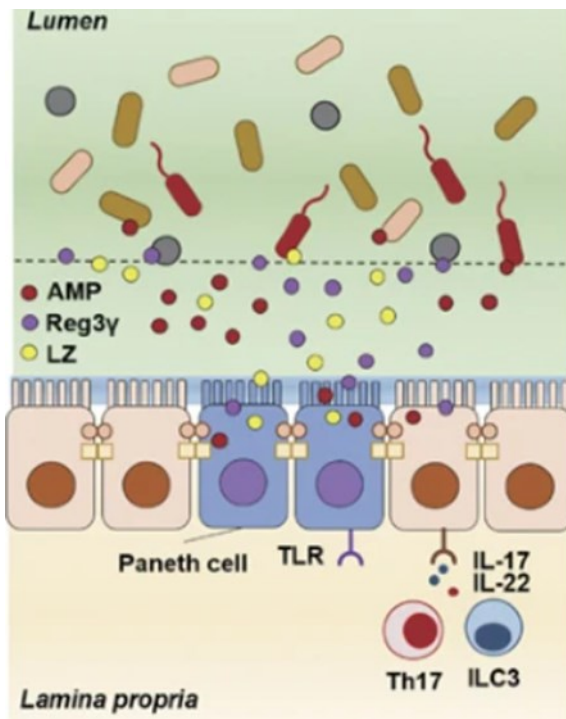


Figura 2. Barriera chimica intestinale – funzione di segregazione dei batteri intestinali e da parte delle cellule epiteliali intestinali.²

Le funzioni principali dell'intestino sono svolte da cellule epiteliali intestinali che sono ricoperte da diverse barriere, che forniscono protezione di tipo fisico e meccanico. Le cellule epiteliali intestinali si distinguono in cellule epiteliali assorbenti, cellule caliciformi, cellule di Paneth e svolgono due funzioni fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi dell'intestino. In particolare, le cellule di Paneth presentano un ruolo essenziale per la prevenzione di processi infiammatori intestinali mediante una funzione di segregazione, ovvero la separazione del microbiota intestinale dalle cellule immunitarie presenti nell'intestino mediante barriere chimiche e fisiche (Fig.2); inoltre svolgono una funzione di mediazione del segnale tra il microbiota intestinale e le cellule immunitarie. Questo permette di controllare ed eventualmente regolare la crescita eccessiva di microbi potenzialmente patogeni.²

¹ Collins, Nguyen, and Badireddy, 'Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine'.

² Okumura and Takeda, 'Roles of Intestinal Epithelial Cells in the Maintenance of Gut Homeostasis'.

L'intestino tenue presenta una parete costituita da quattro strati principali: la mucosa, la sottomucosa, la muscolatura propria e la muscolatura avventizia (Fig.3). La mucosa intestinale è caratterizzata dalla presenza di una serie di cellule mononucleate, come linfociti, plasmacellule, mastociti, macrofagi e leucociti polimorfonucleati; questi ultimi svolgono attività di difesa immunitaria oltre a essere modulatori delle funzioni dell'epitelio intestinale. La sottomucosa intestinale è costituita da uno strato fibro-connettivo che conferisce proprietà elastiche, proteggendo dunque la mucosa intestinale dalle contrazioni peristaltiche; la muscolatura propria è costituita da due strati di muscolatura liscia, mentre quella avventizia è caratterizzata da uno strato delicato di tessuto fibro-adiposo circondato da cellule mesoteliali.³

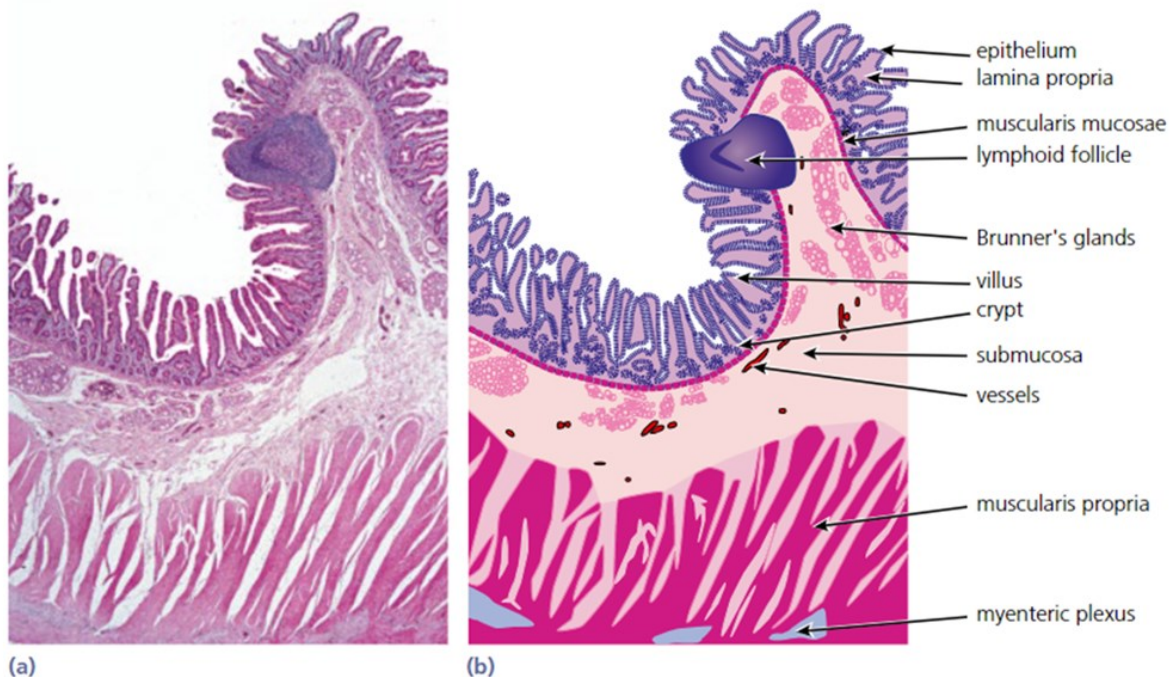


Figura 3. Organizzazione della barriera intestinale. (a) Sezione del tratto gastro-intestinale (b) Delineazione delle strutture specifiche.³

Più in generale, la superficie della mucosa intestinale è rivestita da cellule epiteliali che costituiscono una barriera selettivamente permeabile che è di fondamentale importanza in quanto svolge una funzione di difesa contro agenti potenzialmente patogeni, oltre a una funzione di assorbimento di sostanze e nutrienti. La barriera intestinale è ricoperta da un gel idratato formato da mucine, che sono secrete dalle cellule caliciformi intestinali, le quali creano una barriera impermeabile a particelle di grandi dimensioni, evitando in questo modo il contatto diretto con le cellule epiteliali.⁴ Le cellule epiteliali intestinali impediscono quindi il passaggio transcellulare e paracellulare di diverse sostanze, agenti patogeni e tossine verso il lume: la via transcellulare coinvolge trasportatori specifici che permettono l'assorbimento di nutrienti attraverso la membrana cellulare impermeabile, mentre la via paracellulare consiste nel trasporto di sostanze e nutrienti mediante un complesso giunzionale apicale che è costituito da giunzioni strette (TJ) e giunzioni aderenti (AJ).⁵

³ Chanez-Paredes and Turner, 'Epithelia and Gastrointestinal Function'.

⁴ Turner, 'Intestinal Mucosal Barrier Function in Health and Disease'.

⁵ Suzuki, 'Regulation of Intestinal Epithelial Permeability by Tight Junctions'.

1.1.2 COMPLESSI GIUNZIONALI

Le giunzioni strette (TJ) sono complessi proteici che regolano il passaggio paracellulare di ioni e acqua e sono presenti nelle membrane laterali delle cellule epiteliali intestinali. Il complesso TJ è costituito da proteine scaffold transmembrana, ovvero occludina, claudine, tricellulina, e molecole di adesione giunzionale (Fig.4).

1.1.2.1 STRUTTURA E FUNZIONE DELL'OCCLUDINA

L'occludina è una proteina di membrana della tetraspanina con quattro domini transmembrana: il dominio C-terminale instaura legami con diverse proteine TJ intracellulari, necessari per collegare l'occludina al citoscheletro di actina. L'occludina, mediante le anse extracellulari, interagisce con le cellule adiacenti formando una barriera contro il passaggio di macromolecole.⁶ Studi recenti *in vitro* su monostrati di cellule Caco-2 e *in vivo* sull'intestino di topi hanno evidenziato come la trasfezione dell'RNA a piccola interferenza (siRNA) dell'occludina provochi un aumento del flusso transepiteliale di macromolecole. Questo comporta la riduzione dell'espressione di occludina nelle cellule epiteliali intestinali e conseguente alterazione della giunzione epiteliale stretta (TJ), contribuendo quindi allo sviluppo dell'infiammazione intestinale. I dati ottenuti da questo studio evidenziano che, in condizioni patologiche, la deplezione di occludina consente il flusso paracellulare di macromolecole, inclusi gli antigeni batterici, che comportano una risposta infiammatoria; mentre in normali condizioni di salute, la barriera epiteliale intestinale risulta efficace nel prevenire il flusso macromolecolare.⁷

1.1.2.2 STRUTTURA E FUNZIONE DELLE CLAUDINE

Le claudine sono proteine di membrana della tetraspanina che non presentano alcuna somiglianza di sequenza con l'occludina, e vengono legate al citoscheletro dell'actina mediante l'interazione del dominio C-terminale con le proteine TJ intracellulari. Le claudine, mediante le anse extracellulari, interagiscono con le cellule adiacenti formando barriere o pori per il passaggio di molecole specifiche.⁸ Uno studio recente ha dimostrato che una carenza di claudina-15 nell'intestino compromette il corretto assorbimento del glucosio. Questi risultati suggeriscono che le claudine hanno un ruolo funzionale nella regolazione del flusso ionico e di piccole molecole attraverso i pori TJ, e indicano che la claudina-15 a giunzione stretta può regolare il metabolismo del glucosio; evidenziano inoltre il ruolo delle claudine in tutto il corpo e nei disturbi intestinali associati a carenze di queste proteine, proponendo un nuovo punto di partenza per lo sviluppo di trattamenti innovativi per le malattie paracellulari della barriera intestinale.⁹

1.1.2.3 JUNCTION ADHESION MOLECULE (JAM)

Le molecole di adesione giunzionale (JAM) sono comprese nella famiglia delle immunoglobuline (Ig) e vengono divise in base alle somiglianze di sequenza nei domini citoplasmatici in JAM-A, JAM-B, JAM-C. Diversi studi hanno implicato le JAM nella regolazione della funzione della barriera intestinale e della risposta infiammatoria. Sebbene manchino approfondimenti su tale argomento,

⁶ Suzuki.

⁷ Al-Sadi et al., 'Occludin Regulates Macromolecule Flux across the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier'.

⁸ Suzuki, 'Regulation of Intestinal Epithelial Permeability by Tight Junctions'.

⁹ Tamura et al., 'Loss of Claudin-15, but Not Claudin-2, Causes Na⁺ Deficiency and Glucose Malabsorption in Mouse Small Intestine'.

è stato riportato come JAM-A sembri influenzare la regolazione della permeabilità paracellulare, la migrazione cellulare e la migrazione dei leucociti.¹⁰

1.1.2.4 STRUTTURA E FUNZIONE DELLA TRICELLULINA

La tricellulina è invece una proteina di membrana del tetraspan che è coinvolta nelle giunzioni bicellulari (bTJ) e in quelle tricellulari (tTJ). Risultati emersi da un recente studio evidenziano come la bassa espressione di tricellulina permetta il passaggio di macromolecole; invece, ad espressione più elevata, essa porta alla formazione di una barriera per le macromolecole nelle tTJ e di una barriera per soluti di qualsiasi dimensione nelle bTJ.¹¹ Le proteine di membrana, che costituiscono i complessi giunzionali, interagiscono inoltre con le proteine zonula occludens (ZO), ovvero proteine multidominio che consentono un'impalcatura intracellulare nelle TJ e sono necessarie per la regolazione e il mantenimento della struttura delle TJ.¹²

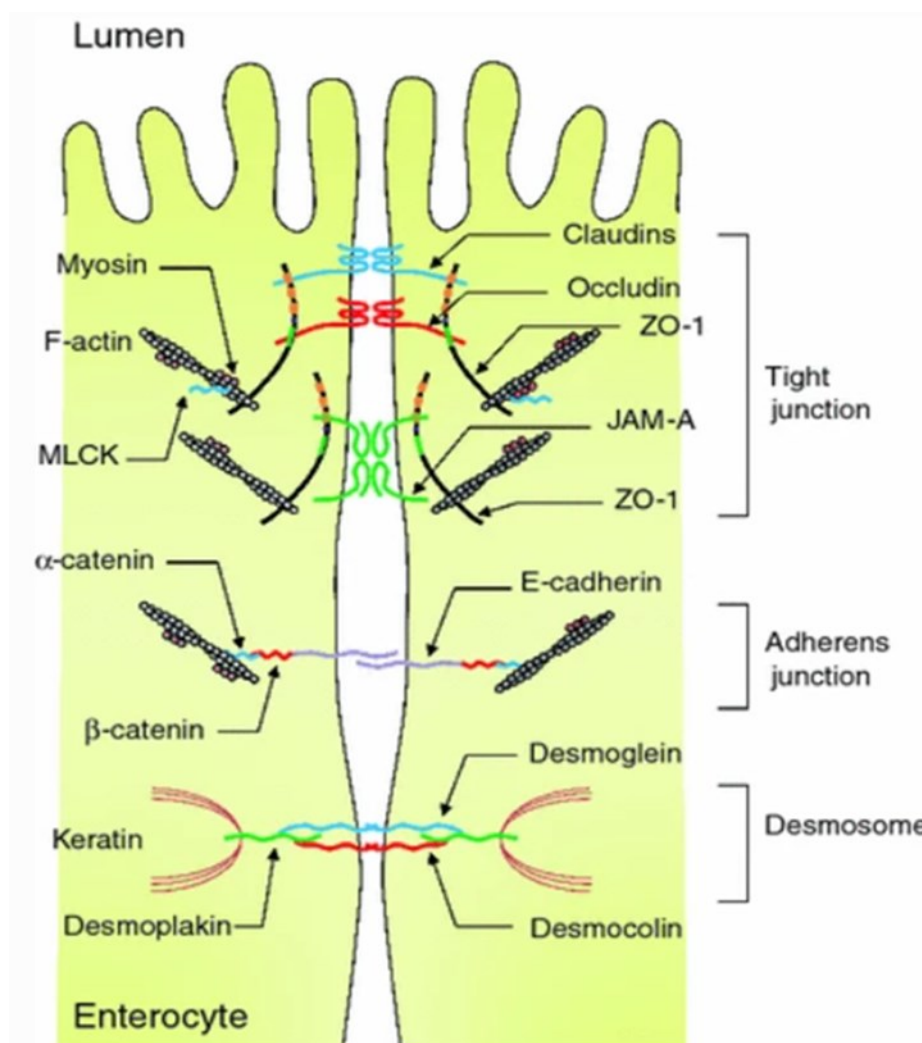


Figura 4. Struttura molecolare della giunzione intercellulare.⁸

¹⁰ Laukoetter et al., 'JAM-A Regulates Permeability and Inflammation in the Intestine in Vivo'.

¹¹ Krug et al., 'Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability'.

¹² Suzuki, 'Regulation of Intestinal Epithelial Permeability by Tight Junctions'.

1.1.3 MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) sono caratterizzate da un'inflammatione cronica e recidivante dell'epitelio intestinale. Le due forme principali di IBD sono il Morbo di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (UC). Il tasso medio di incidenza grezzo, ovvero il rapporto tra il numero di casi e la popolazione di riferimento, per il periodo 2015-2018 è stato di 15,6 casi ogni 100.000 cittadini/anno per la colite ulcerosa (CI 95%, 14,5-16,8) e 9,3 casi per la malattia di Crohn (CI 95%, 7,8-10,8) (Tab.1). In entrambe le malattie, i tassi grezzi sono più elevati tra gli uomini (colite ulcerosa 17,5 e morbo di Crohn 10,5) rispetto alle donne (colite ulcerosa 13,9 e morbo di Crohn 8,2).¹³

	Crohn's disease				Ulcerative colitis			
	n.	Crude rate	Std. rate	CI 95%	n.	Crude rate	Std. rate	CI 95%
Women	579	8.2	8.3	7.6-8.9	987	13.9	13.5	12.6-14.3
Men	701	10.5	10.6	9.0-11.4	1167	17.5	17.4	16.4-18.4
People	1280	9.3	9.4	8.9-9.9	2154	15.6	15.3	14.7-16.0

Tabella 1. Numero di casi, tassi di incidenza grezzi e standardizzati in base all'età e al sesso per 100.000 persone/anno con corrispondenti intervalli di confidenza del 95% per il morbo di Crohn e colite ulcerosa.¹³

L'eziologia delle IBD non è ancora definita in modo specifico, ma diversi studi propongono il coinvolgimento diretto della suscettibilità individuale, dell'ambiente esterno, della flora microbica intestinale e delle risposte immunitarie nella patogenesi delle IBD.¹⁴ I fattori ambientali possono influire sullo sviluppo delle IBD, infatti in alcuni studi si è osservato come il peggioramento dell'igiene personale, una minor qualità degli alimenti, dell'acqua, degli alloggi, oltre a un maggior impiego di antibiotici, portino allo sviluppo di un sistema immunitario più debole e meno performante, generando una risposta immunitaria meno efficace. Il fumo di sigaretta è uno dei fattori ambientali che influisce notevolmente sull'insorgenza di IBD, mediante meccanismi differenti a seconda della forma di patologia. Ad esempio, il fumo è un fattore di rischio riconosciuto per il morbo di Crohn perché aumenta la frequenza di ricadute e la sua interruzione migliora il decorso della malattia. L'evidenza che collega i fattori ambientali all'IBD è abbastanza solida, ma sembra che nessun fattore ambientale da solo possa causare direttamente CD o CU, e che debba essere presente anche una predisposizione genetica intrinseca alla malattia. La patogenesi delle IBD è ricondotta inoltre a un'errata risposta del sistema immunitario: l'abbondante presenza di leucociti nella lamina propria intestinale causa infatti un'inflammatione dell'epitelio intestinale. Se tale inflammatione persiste e diventa cronica rappresenta una risposta immunitaria inappropriata che provoca effetti dannosi persistenti nell'intestino. Infatti, sia il morbo di Crohn che la colite ulcerosa vengono definiti come processi infiammatori cronici dovuti ad anomalie del sistema immunitario intestinale.¹⁵

¹³ Crocetti, Bergamaschi, and Russo, 'Population-Based Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Diseases in Milan (Northern Italy), and Estimates for Italy'.

¹⁴ Zhang, 'Inflammatory Bowel Disease'.

¹⁵ 'Eziopatogenesi Delle Malattie Infiammatorie Intestinali'.

1.1.3.1 IL MORBO DI CROHN (CD)

Il morbo di Crohn (CD) è una patologia infiammatoria cronica intestinale di eziologia sconosciuta che provoca un processo infiammatorio di tipo transmurale; l'infiammazione può raggiungere gli strati più profondi della parete cellulare e può verificarsi lungo tutto il tratto gastrointestinale. Questa patologia è associata ad una risposta immunitaria alterata in soggetti geneticamente predisposti e in determinate condizioni ambientali, ma la patogenesi non è stata ancora definita in modo univoco. L'alterazione della risposta immunitaria è legata a due fattori principali, ovvero un danneggiamento della barriera epiteliale intestinale e apoptosi incontrollata dei linfociti T. Le cellule epiteliali intestinali eliminano il contenuto citoplasmatico non necessario prevenendo la disseminazione batterica. Questo processo è regolato dai geni ATG16L1 e IRGM, i quali, se presentano un'alterazione, aumentano il rischio di sviluppare CD. Alcuni fattori ambientali possono aumentare il rischio di insorgenza di CD, come il fumo di sigaretta, l'assunzione di aspirina o farmaci antinfiammatori non steroidei. Tuttavia, non è stata ancora dimostrata una stretta correlazione tra uno di questi fattori e lo sviluppo di CD.¹⁶ In uno studio di coorte è stato osservato come i pazienti affetti da CD presentino un'espressione ridotta di mucine, importanti componenti strutturali del muco intestinale. Le alterazioni della struttura e della quantità di mucine potrebbero alterare la funzione di barriera del muco e avere un ruolo nell'avvio e nel mantenimento dell'infiammazione della mucosa nel morbo di Crohn.¹⁷ In un ulteriore studio sono state inoltre osservate variazioni nell'espressione delle proteine TJ responsabili di un'alterazione della permeabilità della barriera intestinale mediante formazione di punti di discontinuità strutturale. La compromissione della barriera intestinale è dovuta ad una riduzione dell'espressione di proteine TJ come l'occludina, la claudina-5 e la claudina-8, le quali impediscono il passaggio di macromolecole, mentre la claudina-2, coinvolta nella formazione di pori, è fortemente sovraregolata. La ridotta espressione delle proteine TJ e la sovraregolazione della claudina-2 possono essere indotte da molecole pro-infiammatorie coinvolte nella risposta immunitaria, come il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), l'interferone γ (IFN- γ) e l'interleuchina-13 (IL-13).¹⁸

1.1.3.2 LA COLITE ULCEROSA (CU)

La colite ulcerosa (CU) è una malattia infiammatoria cronica intestinale di eziologia sconosciuta, e consiste in un'infiammazione della mucosa che inizia nel retto e si estende nel colon in modo continuo: è tipicamente limitata allo strato mucoso e causa un danno superficiale alla parete intestinale. La patogenesi della CU non è completamente compresa, ma è stato osservato che smettere di fumare, per i pazienti fumatori, rappresenta un fattore di rischio ambientale nello sviluppo della CU, mentre nel CD la cessazione del fumo migliora la condizione infiammatoria dell'intestino. Tuttavia, ciò rimane ancora un'ipotesi e richiede ulteriori approfondimenti. In uno studio di coorte condotto in India è stato dimostrato come una dieta vegetariana possa svolgere un'azione protettiva contro lo sviluppo di tale patologia. Fattori di rischio nello sviluppo di CU sono condizioni che influenzano il microbiota intestinale e la risposta immunitaria intestinale, come

¹⁶ Baumgart and Sandborn, 'Crohn's Disease'.

¹⁷ Desreumaux et al., 'Abnormalities in Mucin Gene Expression in Crohn's Disease'.

¹⁸ Zeissig et al., 'Changes in Expression and Distribution of Claudin 2, 5 and 8 Lead to Discontinuous Tight Junctions and Barrier Dysfunction in Active Crohn's Disease'.

l'assunzione di antibiotici o cambiamenti radicali nella dieta dell'individuo. La CU è una malattia della barriera intestinale guidata inizialmente da una cellula epiteliale o da una disfunzione epiteliale intestinale strutturale dovuta all'alterazione delle componenti della barriera intestinale e della risposta immunitaria (Fig.5).¹⁹

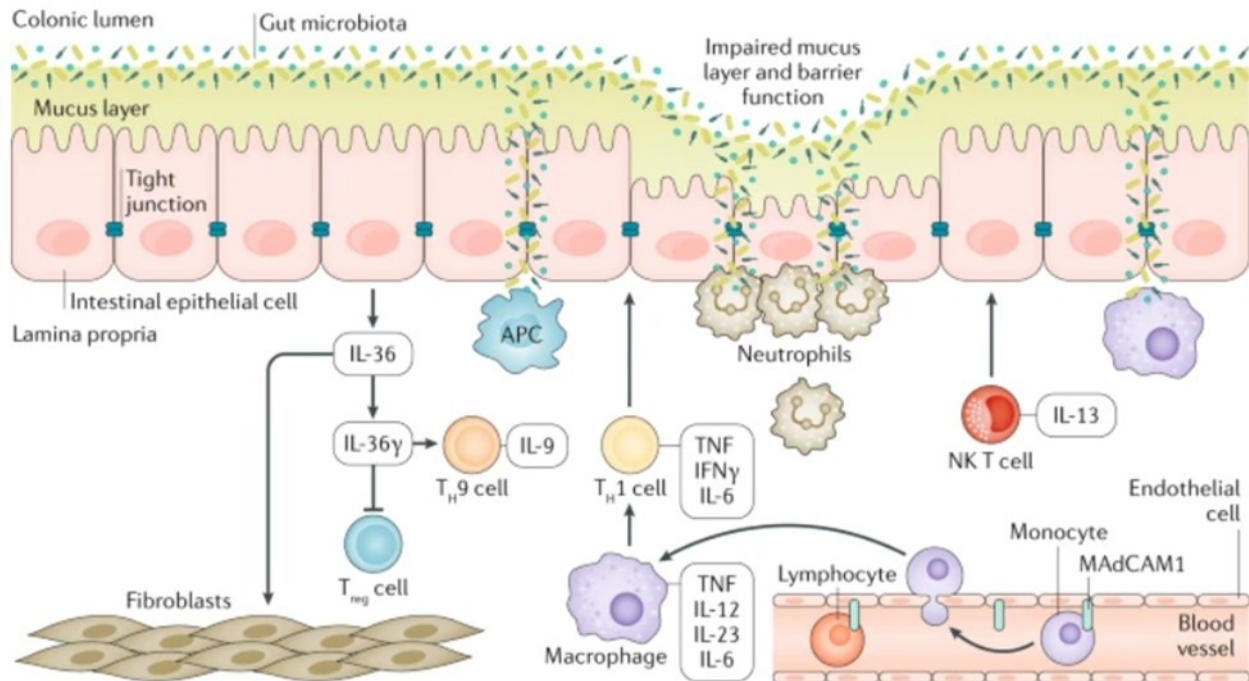


Figura 5. Fisiopatologia della colite ulcerosa.¹⁹

Ad esempio, le variazioni della quantità o della composizione delle mucine secrete nel colon potrebbero portare a una ridotta protezione della mucosa e quindi avere un ruolo nella patogenesi della CU. Infatti, nella colite ulcerosa attiva, è stato osservato come lo strato di muco risulti più sottile rispetto a una condizione fisiologica dell'intestino, e le cellule caliciformi, le quali sintetizzano le mucine secretorie, contengono meno mucina e sembrano essere presenti in numero ridotto.²⁰ Inoltre, diversi studi dimostrano come le citochine pro-infiammatorie, incluso il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), l'interferone γ (IFN- γ) e l'interleuchina-13 (IL-13), possano alterare la funzione di barriera modificando la funzione e l'espressione delle proteine TJ. Ad esempio, la tricellulina risulta specificamente sotto regolata da IL-13 nei pazienti affetti da CU. Questa condizione comporta un maggiore assorbimento paracellulare di macromolecole e un rischio più elevato di infiammazione della mucosa intestinale.²¹

¹⁹ Kobayashi et al., 'Ulcerative Colitis'.

²⁰ Van Klinken et al., 'Sulphation and Secretion of the Predominant Secretory Human Colonic Mucin MUC2 in Ulcerative Colitis'.

²¹ Krug et al., 'Tricellulin Is Regulated via Interleukin-13-Receptor A2, Affects Macromolecule Uptake, and Is Decreased in Ulcerative Colitis'.

1.1.3.3 MANIFESTAZIONI EXTRAINTESTINALI (EIM)

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD), in particolare il morbo di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (UC), sono associate a varie manifestazioni extraintestinali (EIM), la cui prevalenza varia dal 25% al 40%. La manifestazione delle EIM è estremamente eterogenea e può interessare occhi, pelle, articolazioni, fegato e vie biliari, reni, polmoni e sistema vascolare.²² In alcuni studi è stato osservato come i pazienti che presentano una forma di IBD sono più predisposti a sviluppare celiachia e viceversa. Questo è dovuto al fatto che sia la celiachia che le IBD provocano un'alterazione della mucosa intestinale con conseguente aumento della permeabilità. Si ritiene che l'aumento della permeabilità intestinale svolga un ruolo centrale nella patogenesi di IBD e della malattia celiaca, consentendo l'interazione tra l'antigene e il sistema immunitario della mucosa che porta a una risposta immunitaria anormale. Il meccanismo preciso di questa associazione deve ancora essere compreso, ma sembra che l'infiammazione della mucosa associata alla celiachia costituisca l'inizio di una sequenza di eventi che porta allo sviluppo di IBD.²³

Le manifestazioni muscoloscheletriche sono le caratteristiche extraintestinali più frequenti delle IBD e la loro prevalenza oscilla tra il 6% e il 46% dei pazienti. In diversi studi sono stati descritti due modelli principali di manifestazioni reumatologiche: il primo è caratterizzato da un'artrite oligoarticolare asimmetrica che colpisce le grandi articolazioni ed è spesso associata a IBD attive; la seconda è caratterizzata da artrite simmetrica poliarticolare che colpisce principalmente le piccole articolazioni di entrambe le mani, ed è indipendente dall'attività delle IBD. Entrambi i modelli infiammatori periferici sono artrosici non erosivi e generalmente non deformanti. Il primo tipo di artrite è correlato all'attività della malattia e quindi la terapia dell'IBD sottostante è il trattamento più opportuno e prevede l'impiego di aminosalicilati e corticosteroidi; mentre il secondo tipo di artrite richiede generalmente un trattamento a lungo termine, che comprende un intensivo periodo di fisioterapia associato alla somministrazione di farmaci immunomodulanti.²⁴

Il coinvolgimento polmonare è considerato un raro EIM di IBD, tuttavia, le anomalie polmonari nell'IBD possono presentarsi anni dopo l'inizio della malattia intestinale e possono interessare qualsiasi parte dei polmoni. Infatti, esistono diverse tipologie di tali manifestazioni, come malattie delle vie aeree, malattie del parenchima polmonare, malattie tromboemboliche, malattie pleuriche, fistole enterico-polmonari. Le manifestazioni polmonari associate a IBD si verificano perché le cellule infiammatorie attivate nei tessuti intestinali sono in grado di produrre diverse citochine circolanti come l'interleuchina IL-1, IL-2, IL-6 e il fattore di necrosi tumorale (TNF- α). Questi e altri mediatori possono regolare l'espressione delle molecole di adesione delle cellule endoteliali, alterare la migrazione dei leucociti, aumentare la produzione di metaboliti reattivi dannosi dell'ossigeno e indurre danni al parenchima polmonare.²⁵

Altri studi dimostrano l'associazione di IBD e manifestazioni renali, come la nefrolitiasi, dovuta ad un disturbo dell'omeostasi degli ossalati. Questa alterazione può essere causata se il calcio, che normalmente lega l'ossalato e ne impedisce l'assorbimento, si complessa con gli acidi grassi non assorbiti presenti nell'intestino, favorendo il riassorbimento dell'ossalato del colon e la successiva

²² Colia, Corrado, and Cantatore, 'Rheumatologic and Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Diseases'.

²³ Shah et al., 'Link Between Celiac Disease and Inflammatory Bowel Disease'.

²⁴ Atzeni et al., 'Combined Therapeutic Approach'.

²⁵ Ji, 'Pulmonary Manifestations of Inflammatory Bowel Disease'.

eliminazione renale, aumentando quindi il rischio di formazione di calcoli di ossalato nei reni. Un'altra causa di formazione di calcoli renali può essere la perdita del batterio *Oxalobacter formigenes*, un batterio anaerobico del microbiota intestinale responsabile della degradazione degli ossalati.²⁶

Diversi disturbi ematologici sono stati inoltre evidenziati in pazienti con IBD, come trombosi, alterazione dell'attività piastrinica, neutropenia ciclica, mielodisplasia e porpora trombocitopenica idiopatica. L'anemia è la manifestazione ematologica più frequente nei soggetti affetti da IBD e l'eziologia è multifattoriale. Una delle cause principali è la carenza di ferro, vitamina B12 e folati, dovuta ad un malassorbimento intestinale e ad una crescita batterica elevata.²⁷

Diversi studi di coorte hanno definito la relazione tra l'infiammazione intestinale e le patologie cardiovascolari, suggerendo che i pazienti con IBD, in particolare donne e pazienti giovani, hanno un rischio significativamente maggiore di infarto del miocardio e ictus.²⁸

Le manifestazioni epatobiliari inoltre costituiscono alcune delle manifestazioni extraintestinali più comuni di IBD. Tipicamente adottano un decorso indipendente dall'attività intestinale e sono presenti sia nella CU che nella CD. La manifestazione epatobiliare più comune di IBD è la colangite sclerosante primitiva (PSC), una malattia fibrosclerotica cronica dell'albero biliare intraepatico ed extraepatico, la quale porta allo sviluppo di un'ipertensione portale, cirrosi e insufficienza epatica. Il danno al fegato può verificarsi inoltre in seguito al trattamento farmacologico delle IBD in quanto la maggior parte dei farmaci utilizzati nell'IBD presenta una potenziale epatotossicità.²⁹

Le IBD si presentano spesso come un complesso processo infiammatorio in cui i sintomi intestinali possono essere accompagnati da EIM ausiliari, ma anche da malattie autoimmuni. Il possibile coinvolgimento di più organi nelle IBD sottolinea l'importanza di una maggiore consapevolezza di queste potenziali complicanze al fine di aiutare la terapia e ridurre la morbilità generale nei pazienti affetti.³⁰

²⁶ Cury, Moss, and Schor, 'Nephrolithiasis in Patients with Inflammatory Bowel Disease in the Community'.

²⁷ Guagnozzi, 'Anemia in Inflammatory Bowel Disease'.

²⁸ Fumery et al., 'Thromboembolic Events and Cardiovascular Mortality in Inflammatory Bowel Diseases'.

²⁹ Rojas-Feria, 'Hepatobiliary Manifestations in Inflammatory Bowel Disease'.

³⁰ Colia, Corrado, and Cantatore, 'Rheumatologic and Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Diseases'.

1.2 TRATTAMENTI TRADIZIONALI E INNOVATIVI PER IBD

1.2.1 TRATTAMENTI TRADIZIONALI PER IBD

La terapia medica per le IBD è progredita notevolmente nell'ultimo decennio con l'introduzione di terapie mirate, l'ottimizzazione delle vecchie terapie e una migliore comprensione del sistema immunitario della mucosa oltre alla genetica coinvolta nella patogenesi dell'IBD. I trattamenti convenzionali mirano a controllare i sintomi e a mantenere la remissione attraverso l'utilizzo di aminosalicilati, corticosteroidi e immunomodulatori. L'introduzione di inibitori specifici del fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) consente una remissione di lunga data e modifica positivamente il decorso dell'IBD nei pazienti. Tuttavia, una mancata risposta immunitaria primaria agli inibitori del TNF- α è stata osservata fino al 40% dei pazienti negli studi clinici e nel 23-46% circa dei pazienti, dopo un anno di trattamento, si è verificata una perdita della risposta immunitaria secondaria, ovvero una riduzione dei linfociti che costituiscono la memoria immunologica. Una frazione considerevole di pazienti risulta quindi non rispondente ai trattamenti disponibili, il che richiede l'ideazione di nuove strategie terapeutiche.³¹

1.2.1.1 AMINOSALICILATI NELLA REMISSIONE DELLE IBD

Gli aminosalicilati per l'IBD includono principalmente la sulfasalazina tradizionale (SASP) e altri tipi di farmaci a base di acido 5-aminosalicilico (5-ASA). Nel trattamento dell'IBD, SASP è il profarmaco, la sulfapiridina (SP) è il vettore e 5-ASA è la parte attiva. I meccanismi d'azione di 5-ASA e SASP includono l'interferenza con il metabolismo dell'acido arachidonico, lo scavenging delle specie reattive dell'ossigeno e gli effetti sulla funzione dei globuli bianchi e sulla produzione di citochine. Tuttavia, non è noto se le proprietà terapeutiche del SASP siano dovute alla molecola intatta, ai componenti 5-ASA o alla sulfapiridina.³² L'efficacia terapeutica dei preparati di acido aminosalicilico per IBD rimane controversa: una revisione ha suggerito che le preparazioni orali di 5-ASA non hanno alcun vantaggio significativo nel mantenere la remissione del CD nei pazienti con celiachia;³³ uno studio caso-controllo ha riportato che la terapia di mantenimento con 5-ASA può ridurre del 75% il rischio di cancro del colon-retto nei pazienti con CU;³⁴ un altro studio ancora ha invece evidenziato che gli effetti collaterali associati al 5-ASA, tra cui flatulenza, nausea, dolore addominale, diarrea e mal di testa, sono generalmente lievi. Al contrario, gli effetti collaterali della SASP, come l'infertilità, l'anemia emolitica, la fotosensibilizzazione e la granulocitosi, sono molto maggiori di quelli del 5-ASA (Fig. 6). L'efficacia e la sicurezza di questa terapia farmacologica non è delineata in modo chiaro, ed è quindi necessario un ulteriore sviluppo di trattamenti e nuovi approcci terapeutici.³⁵

³¹ Cai, Wang, and Li, 'Treatment of Inflammatory Bowel Disease'.

³² Punched, Greenfield, and Thompson, 'Mechanism of Action of 5-Aminosalicylic Acid'.

³³ Akobeng et al., 'Oral 5-Aminosalicylic Acid for Maintenance of Medically-Induced Remission in Crohn's Disease'.

³⁴ Eaden et al., 'Colorectal Cancer Prevention in Ulcerative Colitis'.

³⁵ Punched, Greenfield, and Thompson, 'Mechanism of Action of 5-Aminosalicylic Acid'.

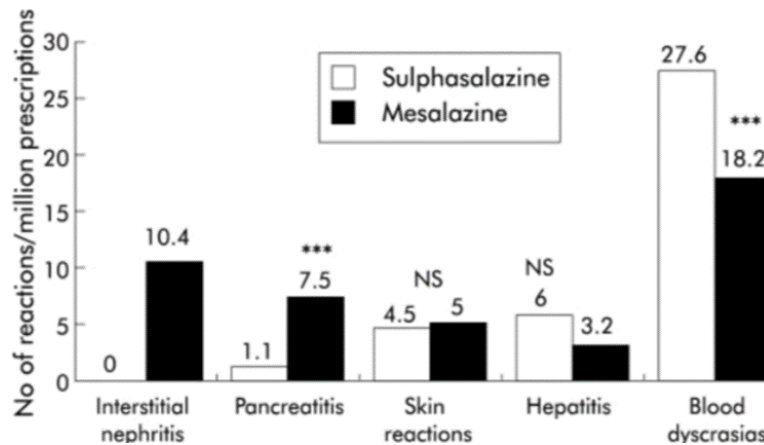


Figura 6. Numero reazioni avverse per milione di prescrizioni di sulfasalazina (SASP) e mesalazina (5-ASA). (*** $p < 0,001$; NS, non significativo).³⁵

1.2.1.2 LA TERAPIA ANTI-TNF- α PER LA REMISSIONE DI IBD

La terapia anti-TNF- α è stata introdotta negli ultimi anni ed è un nuovo approccio per mantenere la remissione delle IBD. Il TNF- α appartiene alla famiglia delle citochine e svolge un ruolo importante nell'infiammazione: la sovraespressione del TNF- α può causare infiammazione cronica e portare a malattie autoimmuni e danni ai tessuti. Gli anticorpi monoclonali anti-TNF- α , come Infliximab (IFX) e Adalimumab (ADA), esercitano effetti terapeutici inibendo le risposte infiammatorie associate al TNF- α ed un eventuale danno tissutale. Uno studio randomizzato controllato ha valutato l'efficacia di IFX in pazienti con CU da moderata a grave, dimostrando che i tassi di ospedalizzazione e chirurgia correlati alla CU sono diminuiti del 7% dopo 54 settimane di trattamento con IFX.³⁶ Il trattamento anti-TNF- α , tuttavia, non è sempre efficace: fino al 40% dei pazienti non risponde agli inibitori del TNF- α e quasi il 23-46% dei pazienti presenta una perdita di risposta secondaria dopo un anno dal trattamento con anti-TNF- α .³⁷

1.2.1.3 CORTICOSTEROIDI ORALI PER IL TRATTAMENTO DI IBD

I corticosteroidi orali (CS) sono stati utilizzati per il trattamento delle IBD dagli anni '50 e possono indurre efficacemente la remissione quando si verifica una riacutizzazione dell'infiammazione intestinale interagendo e attivando un recettore citoplasmatico dei glucocorticoidi (CSs) che, a sua volta, lega specifici fattori di trascrizione proinfiammatori per inibire la trascrizione di alcuni geni infiammatori.³⁸ Uno studio recente ha dimostrato che i CS sono più efficaci del 5-ASA nel trattamento della celiachia e altri studi hanno riportato l'efficacia dei CS nel trattamento delle manifestazioni extraintestinali causate da IBD.³⁹ Sebbene sia stata dimostrata l'efficacia dei CS nella remissione delle IBD, non dovrebbero essere utilizzati per questo scopo perché possono causare numerosi effetti collaterali, come infezioni opportunistiche, diabete mellito, ipertensione, effetti oculari, tromboembolismo venoso (TEV) e osteoporosi.⁴⁰

³⁶ Sandborn et al., 'Colectomy Rate Comparison After Treatment of Ulcerative Colitis With Placebo or Infliximab'.

³⁷ Ben-Horin, Kopylov, and Chowers, 'Optimizing Anti-TNF Treatments in Inflammatory Bowel Disease'.

³⁸ Hayashi et al., 'Effects of Glucocorticoids on Gene Transcription'.

³⁹ Coward et al., 'Comparative Effectiveness of Mesalamine, Sulfasalazine, Corticosteroids, and Budesonide for the Induction of Remission in Crohn's Disease'.

⁴⁰ Curkovic, Egbring, and Kullak-Ublick, 'Risks of Inflammatory Bowel Disease Treatment with Glucocorticosteroids and Aminosalicylates'.

1.2.1.4 EFFICACIA E SICUREZZA DEI TRATTAMENTI TRADIZIONALI PER IBD

L'efficacia dei trattamenti tradizionali per le IBD è stata dimostrata in diversi studi, tuttavia, un numero considerevole di pazienti non riesce a raggiungere la remissione clinica dopo il trattamento, o perde l'efficacia dello stesso con il progredire della patologia nel tempo. Inoltre, sono necessari un maggior numero di dati clinici sulla sicurezza a lungo termine dei farmaci impiegati, perché gli aminosalicilati e i corticosteroidi comportano numerosi, e in alcuni casi gravi, effetti collaterali. È necessario dunque porre l'attenzione verso lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per le IBD. Con l'approfondimento della ricerca, stanno emergendo nuove terapie per il trattamento di questo genere di patologie, tra cui il miglioramento della microecologia intestinale, il trapianto di cellule staminali e la terapia con esosomi. Queste nuove terapie sono spesso applicate nei protocolli sperimentali, ma sono limitate dal loro impatto poco chiaro sull'IBD.⁴¹

1.2.2 TRATTAMENTI INNOVATIVI PER IBD

Negli ultimi anni è stata posta una maggior attenzione a nuove terapie efficaci per le IBD per contrastare gli effetti avversi delle terapie farmacologiche tradizionali. Una nuova strategia terapeutica per il trattamento di IBD consiste nel trapianto di cellule staminali, le quali possono differenziarsi in più di un tipo di cellule favorendo la rigenerazione dei tessuti danneggiati e aiutando nel ripristino di specifiche funzioni tissutali, promuovendo il raggiungimento dell'integrità della mucosa intestinale nei pazienti con IBD. Sebbene molti studi abbiano confermato l'efficacia del trapianto nel trattamento di alcuni pazienti con IBD, occorre prestare attenzione a causa dell'alto rischio di eventi avversi dopo il trapianto stesso.⁴²

I cambiamenti nella composizione e nella funzione del microbiota intestinale sono stati riscontrati nei pazienti con IBD, sebbene il meccanismo specifico dell'infiammazione intestinale rimanga poco chiaro. Lo sviluppo dell'IBD è strettamente correlato ad una variazione della microecologia intestinale e lo squilibrio tra batteri benefici e batteri patogeni nei pazienti, ciò può innescare una risposta immunitaria anormale nelle persone geneticamente suscettibili, causando lesioni alla mucosa intestinale. Sono stati studiati alcuni trattamenti potenzialmente efficaci per l'IBD nel migliorare la microecologia intestinale mediante l'impiego di antibiotici, probiotici, prebiotici, postbiotici e sinbiotici.⁴³

1.2.2.1 TRATTAMENTI INNOVATIVI PER IL MIGLIORAMENTO DELLA MICROECOLOGIA INTESTINALE

Diversi studi, sia su modelli animali che sull'uomo, suggeriscono che le malattie infiammatorie intestinali (IBD) rappresentano un malfunzionamento dell'equilibrio fisiologico del microbiota intestinale. La microecologia enterica rappresenta quindi un nuovo bersaglio terapeutico per il trattamento delle IBD. Per il ripristino della flora intestinale sembra che l'assunzione di antibiotici, probiotici, prebiotici, sinbiotici e postbiotici provochi meno effetti collaterali rispetto ai trattamenti tradizionali impiegati per le IBD.

Il ruolo degli antibiotici nel trattamento delle IBD è stato notevolmente preso in considerazione: si prevede che gli antibiotici saranno una scelta terapeutica futura per le IBD, data la loro potenziale

⁴¹ Cai, Wang, and Li, 'Treatment of Inflammatory Bowel Disease'.

⁴² Mishra et al., 'Inflammatory Bowel Disease'.

⁴³ Ott et al., 'Reduction in Diversity of the Colonic Mucosa Associated Bacterial Microflora in Patients with Active Inflammatory Bowel Disease'.

influenza sulla composizione del microbiota intestinale. Ad oggi, tuttavia, l'efficacia degli antibiotici per il trattamento di IBD rimane ancora incerta: diversi studi suggeriscono come qualsiasi beneficio fornito dagli antibiotici nella CD e nella CU attiva è probabile che sia modesto, e potrebbe non essere clinicamente significativo (sebbene non vi sia un aumento del rischio di eventi avversi con gli antibiotici rispetto ad un placebo).⁴⁴

I probiotici sono microrganismi vivi che hanno lo scopo di portare benefici alla salute se consumati o applicati al corpo in quanto possono ridurre l'apoptosi delle cellule epiteliali e attenuare l'infiammazione della mucosa intestinale. I probiotici sono solitamente batteri che producono acido lattico, il quale può essere assunto attraverso l'ingestione di cibi fermentati, come yogurt, latticini fermentati e sottoprodotti fermentati di salumi.

I prebiotici sono substrati utilizzati selettivamente dai microbi ospiti e integrati dall'assunzione di legumi, frutta e verdura. In generale, i prebiotici benefici includono polioli, oligosaccaridi e fibre solubili.

I sinbiotici sono invece la combinazione sinergica di probiotici e prebiotici che si può trovare in alcuni alimenti, farmaci e integratori.⁴⁵

I probiotici, i prebiotici e i sinbiotici si sono dimostrati utili nel trattamento delle IBD e la loro associazione a farmaci tradizionali ha suggerito una maggior efficacia nella remissione delle IBD stesse. In uno studio randomizzato sono stati analizzati alcuni probiotici nel trattamento delle malattie infiammatorie intestinali (IBD) a causa dei loro effetti condizionanti la flora intestinale, ma la loro efficacia nell'indurre e mantenere la remissione della malattia è ancora controversa. È stato osservato che i probiotici possono indurre la remissione durante il periodo attivo della CU, ma non hanno evidenti vantaggi terapeutici nel mantenere la remissione della CD e della CU cronica.⁴⁶

I probiotici e i prebiotici utilizzati in studi clinici come trattamento per le IBD hanno evidenziato risultati contrastanti, in quanto si sono dimostrati efficaci nel trattamento delle IBD nel caso di colite ulcerosa, ma la loro efficacia sembra ridotta nel caso della malattia di Crohn.⁴⁷ In un ulteriore studio è stato dimostrato un effetto antinfiammatorio di un dato probiotico sull'infiammazione indotta da Salmonella: il probiotico ha inibito il rilascio di TNF- α agendo direttamente sull'epitelio intestinale ripristinandone l'integrità (Fig.7). Inoltre, da questo studio, è stato osservato che non tutti i probiotici sono innocui sui tessuti intestinali infiammati, e ciò è probabilmente dovuto alla maggiore permeabilità intestinale nei tessuti con IBD.⁴⁸ Sebbene non siano noti i meccanismi precisi dei probiotici responsabili dei benefici per la salute, molti studi suggeriscono che i probiotici sono in grado di influenzare i microbi colonizzatori dell'intestino inibendone l'attaccamento attraverso la produzione di mucina, rafforzando la barriera intestinale e riducendo lo stato di infiammazione intestinale, promuovendo così una condizione fisiologica intestinale. Ulteriori ricerche forniranno informazioni sul grado di permanenza dei cambiamenti indotti dai probiotici, anche se gli studi fino

⁴⁴ Townsend et al., 'Antibiotics for Induction and Maintenance of Remission in Crohn's Disease'.

⁴⁵ Zhang et al., 'Clinical Effects and Gut Microbiota Changes of Using Probiotics, Prebiotics or Synbiotics in Inflammatory Bowel Disease'.

⁴⁶ Chen, Feng, and Liu, 'Efficacy and Safety of Probiotics in the Induction and Maintenance of Inflammatory Bowel Disease Remission'.

⁴⁷ Hedin, Whelan, and Lindsay, 'Evidence for the Use of Probiotics and Prebiotics in Inflammatory Bowel Disease'.

⁴⁸ Tsilingiri et al., 'Probiotic and Postbiotic Activity in Health and Disease'.

ad oggi suggeriscono che è necessario un consumo continuo di probiotici per un effetto benefico e duraturo.



Figura 7. Il probiotico agisce sull'epitelio per proteggere dall'invasione di *Salmonella*. (a) Tessuto non trattato e utilizzato come controllo negativo. (b) *Salmonella* da sola è penetrata con successo nell'epitelio. (c) *Salmonella* non è in grado di penetrare negli strati più profondi dell'epitelio in presenza del probiotico.⁴⁸

I postbiotici sono i principali metaboliti di origine microbica, inclusi gli acidi biliari, gli acidi grassi a catena corta e i metaboliti del triptofano e sono stati notevolmente presi in considerazione perché possono imitare gli effetti sulla salute dei probiotici evitando la necessaria somministrazione di microrganismi vivi, che potrebbero non essere sempre innocui. I postbiotici possono avere attività antinfiammatorie, immunomodulatorie, anti-obesogeniche, antipertensive, ipocolesterolemiche, antiproliferative e antiossidanti. Queste proprietà suggeriscono che i postbiotici possono contribuire al miglioramento della salute del paziente fornendo effetti fisiologici specifici, anche se i meccanismi d'azione non sono stati completamente chiariti. I postbiotici possono essere assunti tramite integratori alimentari privi di microbi, alimenti funzionali fermentati e farmaci profilattici, come trattamento complementare per diverse malattie legate ad una disfunzione della barriera intestinale. La ricerca sui postbiotici rappresenta un'opportunità per sviluppare nuove strategie terapeutiche per il miglioramento della salute.⁴⁹

⁴⁹ Aguilar-Toalá et al., 'Postbiotics'.

2. OBIETTIVI

Gli studi effettuati in questo internato di tesi sono stati condotti nel laboratorio della Prof.ssa Monica Montopoli (D.S.F., Università degli studi di Padova) al fine di valutare potenziali effetti di sostanze di origine naturale nella modulazione di parametri di funzionalità intestinale *in vitro*. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare l'attività di una combinazione di probiotici e sostanze naturali a diverse concentrazioni di impiego in un modello cellulare di adenocarcinoma intestinale umano (Caco-2). Per motivi di segretezza sperimentale il prodotto utilizzato verrà riportato con la sigla P. In particolare, è stata valutata la citotossicità di tale sostanza mediante uno screening a diverse concentrazioni della stessa e l'impiego del Cristal Violet Assay. Una volta selezionate le concentrazioni opportune, lo studio è proseguito andando a valutare il potenziale effetto protettivo di P sull'integrità della barriera intestinale, in basale e sotto stress infiammatorio (TNF- α /IFN- γ e LPS), mediante tecniche di immunofluorescenza.

3. MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

La linea cellulare epiteliale umana Caco-2 deriva da un adenocarcinoma coloretale umano ed è stata definita da Jorgen Fogh presso lo Sloan-Kettering Cancer Research Institute. Tale linea cellulare è stata ampiamente utilizzata come modello della barriera epiteliale intestinale per la sua capacità di differenziarsi spontaneamente una volta raggiunta la confluenza, al contrario di altre linee cellulari epiteliali derivate da altri tumori gastrointestinali.⁵⁰

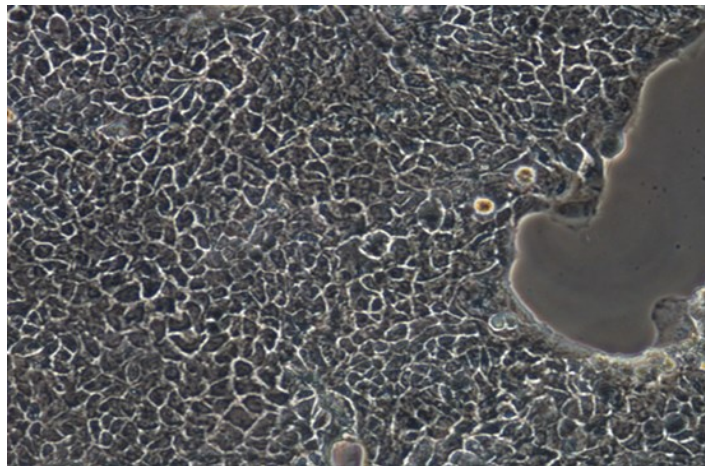


Figura 8 Cellule Caco-2 in coltura.

I primi studi hanno rivelato che le cellule Caco-2 differenziate esprimono diverse proprietà morfologiche e funzionali che caratterizzano gli enterociti dell'intestino tenue, e che raggiunta la confluenza iniziano a polarizzarsi acquisendo un bordo apicale che presenta microvilli. È stato accuratamente documentato che i monostrati polarizzati di Caco-2 rappresentano un correlato affidabile per gli studi sull'assorbimento di farmaci e di altri composti dopo l'assunzione orale nell'uomo.⁵¹ La linea cellulare Caco-2 cresce in adesione e viene mantenuta in coltura con un medium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) addizionato con 10% di FBS (*Fetal Bovine Serum*), 1% di L-glutammina e 1% di una mix antibiotica (Penicillina/Streptomycina). Le colture cellulari sono seminate in flask e devono essere mantenute a 37°C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂.⁵² La morfologia cellulare e il grado di confluenza vengono osservati ogni giorno: all'80% di confluenza, in genere dopo 4-5 giorni, le cellule vengono lavate con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e staccate con tripsina e incubate a 37°C. Previa disattivazione con il medium della linea, si procede con la semina o il passaggio in nuova flask.

⁵⁰ Lea, 'Caco-2 Cell Line'.

⁵¹ Sun et al., 'The Caco-2 Cell Monolayer'.

⁵² Fallini, 'Protocollo - Colture Cellulari'.

3.2 TEST DI VITALITA' CELLULARE

Per effettuare il test di vitalità cellulare è stata utilizzata una colorazione con Crystal Violet, colorante trifenilmetano in grado di legare DNA e proteine delle cellule in adesione. L'uso del Crystal Violet come colorante cellulare è stato indicato per la prima volta negli anni 80 da Robert Koch per la visualizzazione dei bacilli della tubercolosi. Le cellule aderenti si staccano dalle piastre di coltura cellulare durante la morte cellulare, questa caratteristica può essere utilizzata per la quantificazione indiretta della morte cellulare e per determinare le differenze nella proliferazione dopo trattamento con agenti che inducono citotossicità. Il Crystal Violet si lega al fondo del pozzetto in maniera proporzionale alla quantità di DNA presente sul fondo dello stesso, rendendo possibile la sua quantificazione. Per effettuare il test di vitalità tramite Crystal Violet sono state seminate le cellule della linea Caco-2 a una densità di 5000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti, dopo il raggiungimento di una confluenza dell'80% in flask. Le piastre dopo la semina vengono poste in incubatore per 24 ore alla temperatura di 37° (5% CO₂). In seguito, il terreno nei pozzetti viene sostituito con le diverse concentrazioni del composto e le piastre vengono nuovamente incubate per 48 ore. Una volta trascorso il tempo stabilito la piastra viene aspirata, e si procede con 3 lavaggi di PBS e il fissaggio cellulare con una soluzione di paraformaldeide (PFA) al 4% in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce. In seguito, si effettuano 3 lavaggi con PBS, si aggiungono 50µL di Crystal Violet e si lascia agire il colorante per 20 minuti. Terminato il tempo necessario al Crystal Violet per legare il DNA e le proteine, il colorante viene aspirato, si effettuano 3 lavaggi con acqua bidistillata (non è necessaria la sterilità) e si solubilizza il Crystal Violet in 200µL di acido acetico all'1% in acqua; si pone quindi la piastra su agitatore di piastre per 30 minuti. Si esegue infine la lettura di assorbanza con il MultilabelPlate Reader VICTOR TM X3 2030.⁵³

⁵³ 'Gde-Growdex-Technical-Protocols.Pdf'.

3.3 IMMUNOFLUORESCENZA

L'immunofluorescenza è stata impiegata per la valutazione dell'effetto del probiotico sull'espressione delle Tight Junctions. I vetrini sono stati posizionati tramite pinzette sterili all'interno di ogni pozzetto di una piastra da 24 pozzetti, e successivamente è stata eseguita una sterilizzazione mediante radiazione UV per 2 ore. Le cellule vengono dunque seminate secondo protocollo, poste in incubatore per il tempo necessario per la loro crescita ed infine vengono trattate con il composto di interesse per un tempo predefinito in base all'esperimento.⁵⁴ In questo studio le cellule, negli esperimenti eseguiti, sono state trattate con il composto P a concentrazioni diverse: 10^4 e 10^5 CFU/mL. L'esperimento è stato eseguito sia in basale, sia in condizioni di infiammazione fornite rispettivamente da Lipopolisaccaride batterico (LPS) e dall'associazione TNF- α /IFN- γ ; ove previsto, è stato eseguito un pretrattamento con il probiotico per 24h. Una volta trascorso il tempo di trattamento si aspira il terreno, si effettuano 3 lavaggi con PBS e si aggiunge una soluzione di PFA al 4% in PBS goccia a goccia sopra i vetrini: si lascia agire 15 minuti a temperatura ambiente per consentire il fissaggio cellulare. Successivamente si effettua un lavaggio con PBS e si aggiunge una soluzione di Triton 0,1% in PBS, un detergente che permette la permeabilizzazione delle membrane cellulari affinché gli anticorpi possano penetrarvi all'interno. La soluzione viene lasciata agire non oltre 5 minuti, altrimenti vi è il rischio della completa rottura delle membrane cellulari. In seguito, si effettua un ulteriore lavaggio con PBS e si aggiunge una soluzione di PBS + 7% FBS per 20 minuti, in questo modo vengono saturati i siti aspecifici. Dopo aver nuovamente lavato con PBS si aggiunge l'anticorpo primario anti-Occludina diluito 1:200 in PBS + 7% FBS e si lascia in incubatore a 37°C per un'ora. Trascorso il tempo si lava accuratamente con PBS l'eccesso di anticorpo primario e si aggiunge l'anticorpo secondario (Alexa Fluor 488 λ ecc = 490 nm, λ emiss = 525 nm) diluito in PBS 1:1000; la piastra viene quindi incubata a 37°C per un'altra ora. In seguito, l'eccesso di anticorpo secondario viene eliminato, e viene aggiunta una soluzione di Hoechst diluito 1:10000 in H₂O per 20 minuti: questa soluzione consente di evidenziare i nuclei cellulari. Infine, dopo tre lavaggi con acqua bidistillata, al fine di rimuovere i sali che potrebbero creare interferenze durante l'analisi, i vetrini vengono posti su vetrini coprioggetto tramite l'uso del montante Fluormount G.⁵⁵ L'acquisizione delle immagini viene eseguita al microscopio confocale LSM 800, con obiettivo 60X software ZEN 2.1 blue edition. Per evitare fluorescenze indesiderate che potrebbero sovrapporsi al segnale in osservazione, ogni emissione di fluorescenza viene registrata indipendentemente attraverso uno specifico detector e dei filtri ottici che riducono le emissioni di fluorescenza derivanti da altri potenziali cromofori.⁵⁶ Per ogni condizione di trattamento sono state acquisite cinque immagini e scelta una rappresentativa.

⁵⁴ Fallini, 'Protocollo - Immunocitochimica (ICC)'.

⁵⁵ 'Preparazione Dei Campioni'.

⁵⁶ 'Acquisizione Di Immagini'.

3.4 ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante t test di Student utilizzando il software GraphPad Prism versione 7.02 per Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Sono stati considerati significativi i dati con un P value < 0.05.

4. RISULTATI

4.1 SAGGI DI VITALITA' CELLULARE

I primi studi di questo progetto di tesi si sono concentrati sulla valutazione *in vitro* dell'effetto citotossico del probiotico sulla linea Caco-2 mediante l'impiego del test colorimetrico Crystal Violet. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti del probiotico ed è stata analizzata la citotossicità dopo 48 ore. Le concentrazioni utilizzate sono state rispettivamente 10×10^3 , 10×10^4 , 10×10^5 , 10×10^6 , 10×10^7 , 10×10^8 CFU/mL. I risultati ottenuti derivano da 3 test di vitalità eseguiti in giorni differenti per l'ottenimento di dati statistici.

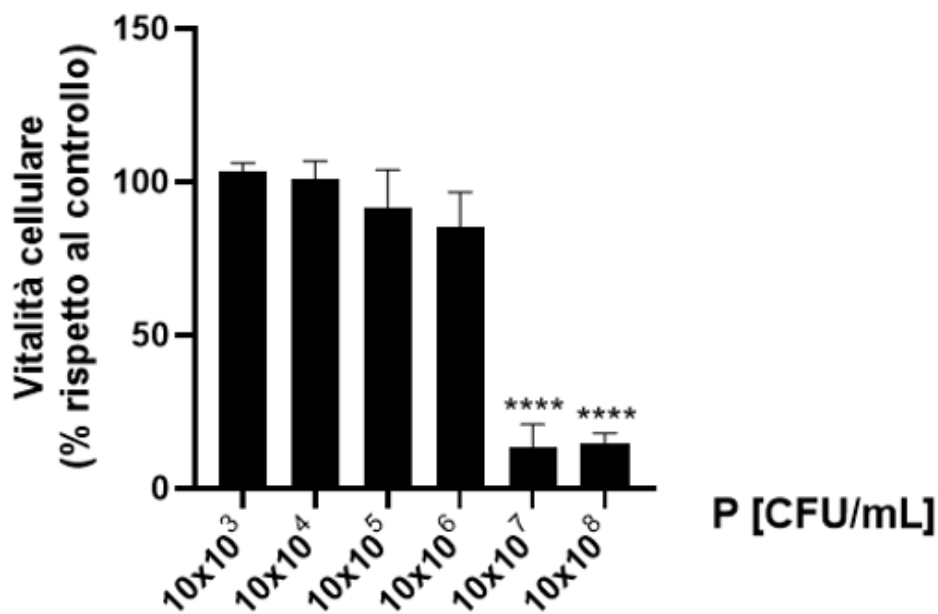


Figura 9. Effetto delle concentrazioni 10×10^3 , 10×10^4 , 10×10^5 , 10×10^6 , 10×10^7 , 10×10^8 CFU/mL del probiotico sulla vitalità della linea cellulare Caco-2 dopo 48h di trattamento. I valori risultano espressi come media percentuale di Abs \pm SEM rispetto al controllo. **** $p < 0.0001$ trattato vs controllo ($n = 3$).

La Fig.9 mostra come il probiotico non risulti citotossico alle concentrazioni di impiego fino alla concentrazione di 10×10^6 CFU/mL. Le due concentrazioni più elevate, rispettivamente 10×10^7 e 10×10^8 CFU/mL riducono la vitalità cellulare rispetto al controllo (circa dell'80%) a 48h di trattamento. Alla luce di questi risultati, per gli esperimenti successivi sono state selezionate le concentrazioni 10×10^4 e 10×10^5 CFU/mL.

4.2 IMMUNOFLUORESCENZA

Dopo aver selezionato le concentrazioni non citotossiche del probiotico mediante CrV, sono state effettuate le analisi di immunofluorescenza, in basale e in condizioni infiammatorie, per verificare una possibile modulazione delle Tight Junctions (Occludina) da parte del composto d'interesse, e il potenziale effetto protettivo fornito da quest'ultimo. L'espressione e la localizzazione di Occludina, proteina di giunzione tra cellule, è essenziale per il mantenimento della struttura dell'epitelio intestinale. Una sua alterazione risulta uno dei fattori responsabili di numerose patologie a sfondo infiammatorio che interessano il distretto intestinale. Lo studio si concentra sull'effetto del probiotico come tale, rispettivamente alle concentrazioni di 10×10^4 e 10×10^5 CFU/mL, e in associazione con gli stimoli infiammatori, rispettivamente LPS alla concentrazione di $250 \mu\text{g/mL}$ e IFN- γ /TNF- α entrambi alla concentrazione di 10 ng/mL .

4.2.1 EFFETTO DEGLI STIMOLI INFIAMMATORI TNF- α /IFN- γ E LPS.

Sono stati confrontati i vetrini del controllo con quelli trattati con gli stimoli infiammatori. Lo stimolo infiammatorio LPS è stato aggiunto per 24 ore alla concentrazione di $250 \mu\text{g/mL}$; l'altro stimolo infiammatorio utilizzato è la combinazione di IFN- γ /TNF- α , entrambi alla concentrazione di 10 ng/mL . In particolare, per il trattamento di questi ultimi, l'IFN- γ ha agito per 3 ore, i vetrini sono stati poi lavati con PBS e di seguito è stato aggiunto TNF- α per le 21 ore successive (24h totali). Trascorso il tempo prescritto è stato eseguito il protocollo di marcatura.

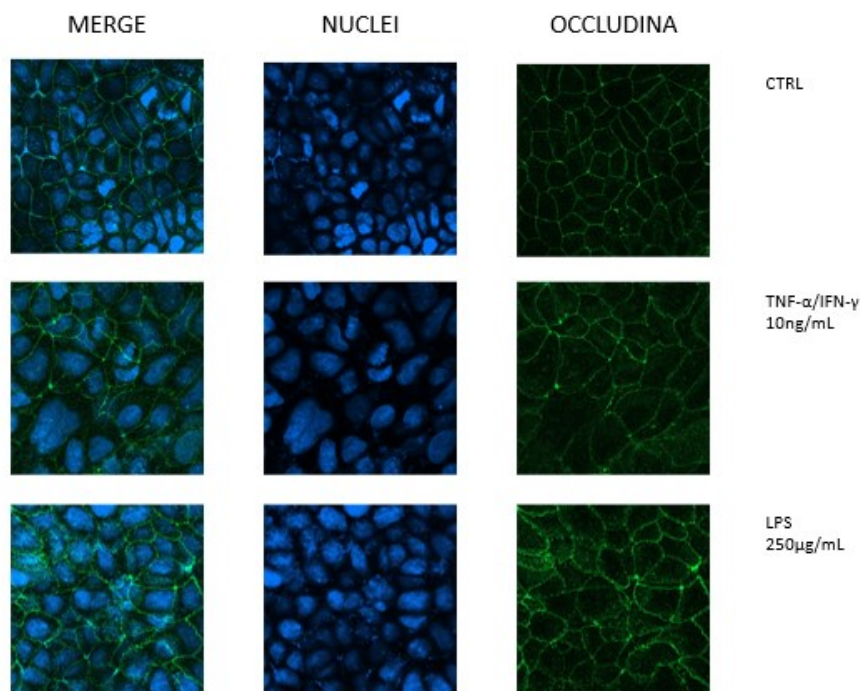


Figura 10. Effetto degli stimoli infiammatori (LPS $250 \mu\text{g/mL}$ e TNF- α /IFN- γ (entrambi 10 ng/mL)) sulla morfologia di Occludina nella linea cellulare Caco-2 dopo 24 ore di trattamento. Marcatura di Occludina (verde, Alexa Fluor 488) e dei nuclei (blu, Hoechst). Acquisizione immagini mediante microscopio confocale LSM 800 e software ZEN 2.1 con obiettivo 60x. Le immagini sono rappresentative di 3 esperimenti.

In Fig.10 è possibile notare come il trattamento con LPS $250 \mu\text{g/mL}$ (24h) e TNF α /IFN- γ (10 ng/mL) (24h) causi un'alterazione della morfologia di Occludina rispetto al controllo, indice di un danno all'integrità di barriera intestinale.

4.2.2 EFFETTO DEL PROBIOTICO SULLA MORFOLOGIA DI OCCLUDINA

In seguito, è stato valutato se il trattamento con le due concentrazioni scelte di probiotico P inducesse una modifica alla morfologia di Occludina.

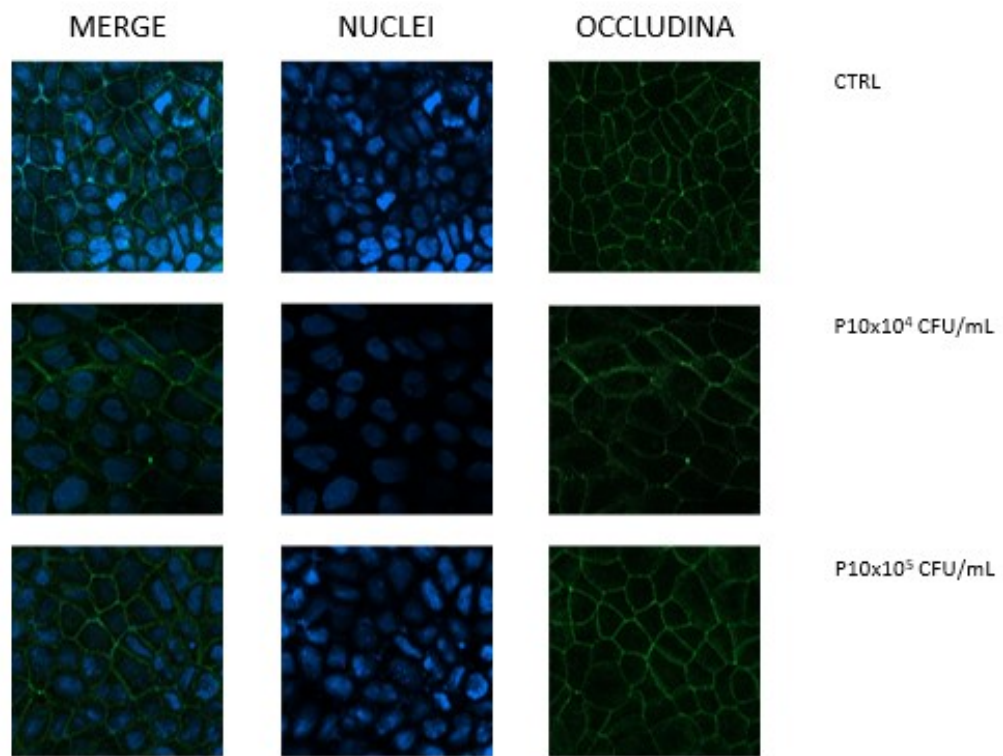


Figura 11. Effetto del probiotico (10×10^4 e 10×10^5 CFU/mL) sulla morfologia di Occludina nella linea cellulare Caco-2 a 48 ore di trattamento. Marcatura di Occludina (verde, Alexa Fluor 488). Acquisizione mediante microscopio confocale LSM 800 e software ZEN 2.1 con obiettivo 60x. Le immagini sono rappresentative di 3 esperimenti.

Le due concentrazioni del probiotico utilizzate, rispettivamente 10×10^4 CFU/mL e 10×10^5 CFU/mL, non hanno evidenziato effetti dannosi nei confronti della morfologia di Occludina a 48h di trattamento rispetto al controllo non trattato (Fig.11).

4.2.3 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL PROBIOTICO IN PRESENZA DI STIMOLI INFIAMMATORI

Infine, è stato valutato il potenziale effetto protettivo delle due concentrazioni di probiotico nei confronti dei singoli stimoli infiammatori in associazione, previo pretrattamento di 24h con il probiotico, sempre alle medesime concentrazioni descritte sopra. Il pannello in Fig.12 mostra come la concentrazione più elevata del probiotico (10×10^5 CFU/ml) migliori il danno indotto da LPS $250 \mu\text{g/ml}$, mentre il miglioramento è meno evidente alla concentrazione più bassa di probiotico, 10×10^4 CFU/ml.

Anche in Fig.13 è possibile notare un miglioramento dei danni indotti da $\text{TNF}\alpha/\text{IFN-}\gamma$ 10ng/ml per mezzo della concentrazione di probiotico più elevata, 10×10^5 CFU/mL.

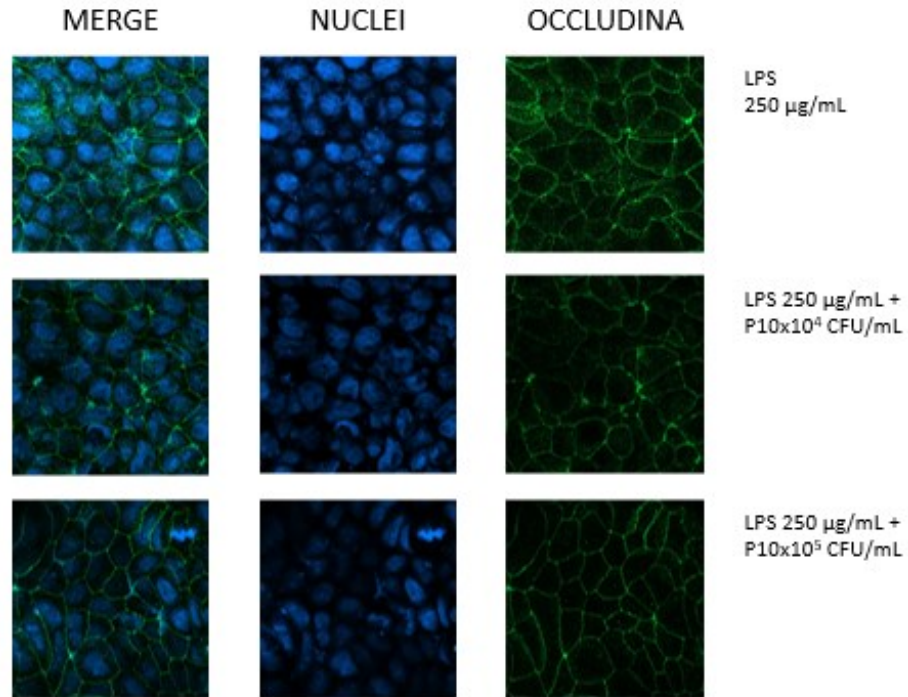


Figura 12. Effetto dell'associazione tra probiotico (10×10^4 e 10×10^5 CFU/mL) e LPS 250 µg/mL sulla morfologia di Occludina nella linea cellulare Caco-2 a 48 ore di trattamento. Marcatura di Occludina (verde, Alexa Fluor 488). Acquisizione mediante microscopio confocale LSM 800 e software ZEN 2.1 con obiettivo 60x. Le immagini sono rappresentative di 3 esperimenti.

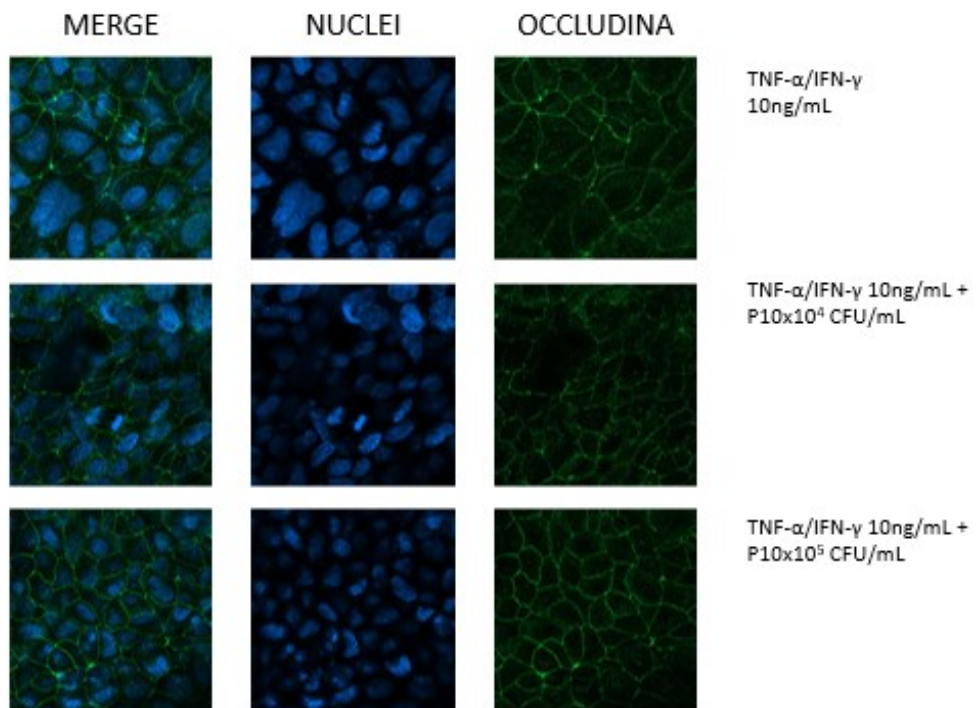


Figura 123. Effetto dell'associazione tra probiotico (10×10^4 e 10×10^5 CFU/ml) e IFN-γ (10 ng/ml)/TNFα (10 ng/ml) sulla morfologia di Occludina nella linea cellulare Caco-2 a 48 ore di trattamento. Marcatura di Occludina (verde, Alexa Fluor 488). Acquisizione mediante microscopio confocale LSM 800 e software ZEN 2.1 con obiettivo 60x. Le immagini sono rappresentative di 3 esperimenti.

Il probiotico, alla concentrazione di utilizzo più elevata (10×10^5 CFU/mL), svolge un ruolo protettivo nei confronti dei danni indotti da uno stimolo infiammatorio alla struttura dell'epitelio intestinale.

5.DISCUSSIONE

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) sono caratterizzate da episodi ripetitivi di infiammazione del tratto gastrointestinale causati da una risposta non fisiologica della microflora intestinale. Le IBD comprendono diversi tipi di patologie, tra cui il morbo di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (CU), che differiscono tra loro per la posizione e la profondità del coinvolgimento nella parete intestinale. Oltre al tratto gastrointestinale, le IBD possono comportare manifestazioni extraintestinali (EIM) più o meno gravi.⁵⁷ Le malattie infiammatorie intestinali si verificano in individui geneticamente suscettibili dopo una risposta immunitaria inappropriata della flora intestinale nei confronti di vari tipi di stimoli. Ad oggi l'eziologia di queste patologie rimane sconosciuta in quanto sono state considerate molte cause di IBD, ma nessuna è universalmente presente in tutti i pazienti. Le IBD si manifestano soprattutto in pazienti giovani e sono malattie croniche, ovvero persistono per tutta la vita del paziente provocando un peggioramento della qualità della vita stessa. Inoltre, le IBD comportano un carico psicologico non indifferente, molti pazienti infatti sviluppano depressione e ansia. I trattamenti tradizionali mirano alla remissione delle IBD e generalmente vengono impiegati aminosalicilati, corticosteroidi o immunomodulatori come gli anticorpi monoclonali anti-TNF- α . Essendo tuttavia non chiare le cause di IBD, questi trattamenti risultano aspecifici e in alcuni casi inefficaci. Inoltre, l'impiego di questi farmaci tradizionali comporta lo sviluppo di numerosi e gravi effetti collaterali. Per questi motivi nasce l'esigenza di porre una maggior attenzione sullo sviluppo di terapie alternative efficaci e sicure.⁵⁸

In questo contesto, l'obiettivo di questo internato di tesi è stato testare la sicurezza e l'efficacia di un mix di probiotici e sostanze di origine naturale, utili in eventuale ottica di terapia coadiuvante ai farmaci tradizionali, che comporti potenzialmente beneficio e una riduzione dell'infiammazione intestinale e degli effetti collaterali associati alle terapie consuete.

In questo studio è stato analizzato l'effetto protettivo del prodotto P a diverse concentrazioni ($P10 \times 10^4$ e $P10 \times 10^5$ CFU/mL) sui danni indotti alle Tight Junctions per mezzo di stimoli infiammatori quali LPS 250 μ g/mL e TNF- α /IFN- γ , entrambi 10ng/mL. Inizialmente è stato valutato l'effetto del probiotico a diverse concentrazioni sulla vitalità cellulare della linea Caco-2 mediante l'impiego del *Crystal Violet Assay*, i cui risultati hanno permesso di individuare concentrazioni non citotossiche da impiegare per gli esperimenti di immunofluorescenza, e di escludere invece quelle che comportavano una riduzione della vitalità cellulare. In seguito, gli esperimenti di immunofluorescenza condotti hanno permesso di valutare l'effetto di vari trattamenti sulle giunzioni strette (TJ) e in particolare sulla morfologia di Occludina. Le modifiche strutturali a tale proteina rappresentano un fattore diagnostico per valutare un danno all'epitelio intestinale *in vitro* e l'efficacia di un prodotto nello svolgere protezione nei confronti di tal danno.⁵⁹ In condizioni fisiologiche l'epitelio intestinale consente l'ingresso passivo di nutrienti, ioni e acqua, limitando l'accesso dei patogeni ai compartimenti tissutali sottostanti attraverso le giunzioni intercellulari. I pazienti con IBD presentano una struttura danneggiata e un'alterata funzionalità delle TJ e ciò

⁵⁷ McDowell, Farooq, and Haseeb, *Inflammatory Bowel Disease*.

⁵⁸ Su et al., 'Inflammatory Bowel Disease and Its Treatment in 2018'.

⁵⁹ Cummins, 'Occludin'.

comporta un errato assorbimento di nutrienti, nonché l'ingresso di agenti patogeni nella circolazione sanguigna.⁶⁰

Sono stati quindi valutati gli effetti degli stimoli infiammatori LPS (250µg/mL) e TNF-α/IFN-γ (entrambi 10ng/mL). Dalle immagini acquisite in immunofluorescenza si nota come le giunzioni strette (TJ) siano visibilmente danneggiate con entrambi gli stimoli infiammatori alle concentrazioni di impiego e alla tempistica di trattamento scelta. Una volta confermato il danno indotto da questi, l'attenzione si è focalizzata sul potenziale effetto protettivo conferito invece dalla mix, sia come tale che in associazione con i precedenti stimoli infiammatori. Dalle immagini acquisite è emerso come il probiotico moduli positivamente l'infiammazione riducendo il danno alla morfologia di Occludina. Per comprendere in maniera più generale gli effettivi benefici di tale prodotto sarà comunque opportuno proseguire valutando l'effetto degli stessi sulla TEER (resistenza elettrica transepiteliale) di un monostrato cellulare differenziato Caco-2, e conseguenti eventuali modifiche alla permeabilità cellulare del monostrato stesso: infatti gli studi effettuati in questo progetto di tesi si inseriscono nell'ambito di un progetto più complesso e articolato, che necessita di maggiori approfondimenti per comprendere i meccanismi alla base della protezione dell'epitelio intestinale da parte di sostanze di origine naturale.

I prodotti naturali sono presi in maggior considerazione perché spesso dimostrano una certa efficacia nel tempo e sembrano comportare meno effetti collaterali rispetto alle terapie tradizionali. Tuttavia, non si comprende chiaramente il meccanismo d'azione di tali sostanze e non sono note tutte le possibili interazioni con altri farmaci assunti dal paziente, dunque non si può prevedere con assoluta certezza se un prodotto di origine naturale è in grado di portare un beneficio privo di rischi.

⁶⁰ Nusrat, Turner, and Madara, 'IV. Regulation of Tight Junctions by Extracellular Stimuli'.

6. BIBLIOGRAFIA

'Acquisizione Di Immagini'. http://www.fluorescencemicroscopy.it/acquisizione_di_immagini.html.

Aguilar-Toalá, J. E., R. Garcia-Varela, H. S. Garcia, V. Mata-Haro, A. F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba, and A. Hernández-Mendoza. 'Postbiotics: An Evolving Term within the Functional Foods Field'. *Trends in Food Science & Technology* 75 (1 May 2018): 105–14. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>.

Akobeng, Anthony K, Dongni Zhang, Morris Gordon, and John K MacDonald. 'Oral 5-Aminosalicylic Acid for Maintenance of Medically-Induced Remission in Crohn's Disease'. Edited by Cochrane IBD Group. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016, no. 9 (28 September 2016). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003715.pub3>.

Al-Sadi, Rana, Khaldun Khatib, Shuhong Guo, Dongmei Ye, Moustafa Youssef, and Thomas Ma. 'Occludin Regulates Macromolecule Flux across the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier'. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 300, no. 6 (June 2011): G1054–64. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00055.2011>.

Atzeni, Fabiola, Sandro Ardizzone, Luca Bertani, Marco Antivalle, Alberto Batticciotto, and Piercarlo Sarzi-Puttini. 'Combined Therapeutic Approach: Inflammatory Bowel Diseases and Peripheral or Axial Arthritis'. *World Journal of Gastroenterology* 15, no. 20 (2009): 2469. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.2469>.

Baumgart, Daniel C, and William J Sandborn. 'Crohn's Disease'. *The Lancet* 380, no. 9853 (November 2012): 1590–1605. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9).

Ben-Horin, Shomron, Uri Kopylov, and Yehuda Chowers. 'Optimizing Anti-TNF Treatments in Inflammatory Bowel Disease'. *Autoimmunity Reviews* 13, no. 1 (January 2014): 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.002>.

Cai, Zhaobei, Shu Wang, and Jiannan Li. 'Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review'. *Frontiers in Medicine* 8 (20 December 2021): 765474. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.765474>.

Chanez-Paredes, Sandra D., and Jerrold R. Turner. 'Epithelia and Gastrointestinal Function'. In *Yamada's Textbook of Gastroenterology*, edited by Timothy C. Wang, Michael Camilleri, Benjamin Lebwohl, Anna S. Lok, William J. Sandborn, Kenneth K. Wang, and Gary D. Wu, 1st ed., 271–82. Wiley, 2022. <https://doi.org/10.1002/9781119600206.ch15>.

Chen, Mingshi, Yan Feng, and Wanli Liu. 'Efficacy and Safety of Probiotics in the Induction and Maintenance of Inflammatory Bowel Disease Remission: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *Annals of Palliative Medicine* 10, no. 11 (November 2021): 11821–29. <https://doi.org/10.21037/apm-21-2996>.

Colià, Ripalta, Addolorata Corrado, and Francesco Paolo Cantatore. 'Rheumatologic and Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Diseases'. *Annals of Medicine* 48, no. 8 (16 November 2016): 577–85. <https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1195011>.

Collins, Jason T., Amanda Nguyen, and Madhu Badireddy. 'Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine'. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459366/>.

Coward, Stephanie, M. Ellen Kuenzig, Glen Hazlewood, Fiona Clement, Kerry McBrien, Rebecca Holmes, Remo Panaccione, et al. 'Comparative Effectiveness of Mesalamine, Sulfasalazine, Corticosteroids, and Budesonide for the Induction of Remission in Crohn's Disease: A Bayesian Network Meta-Analysis: Republished'. *Inflammatory Bowel Diseases* 23, no. 5 (1 May 2017): E26–37. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001158>.

- Crocetti, Emanuele, Walter Bergamaschi, and Antonio Giampiero Russo. 'Population-Based Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Diseases in Milan (Northern Italy), and Estimates for Italy'. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 33, no. 15 (December 2021): e383–89. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000002107>.
- Cummins, Philip M. 'Occludin: One Protein, Many Forms'. *Molecular and Cellular Biology* 32, no. 2 (January 2012): 242–50. <https://doi.org/10.1128/MCB.06029-11>.
- Curkovic, Ivanka, Marco Egbring, and Gerd A. Kullak-Ublick. 'Risks of Inflammatory Bowel Disease Treatment with Glucocorticosteroids and Aminosalicylates'. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 31, no. 3–4 (2013): 368–73. <https://doi.org/10.1159/000354699>.
- Cury, Didia, Alan Moss, and Nestor Schor. 'Nephrolithiasis in Patients with Inflammatory Bowel Disease in the Community'. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, July 2013, 139. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S45466>.
- Desreumaux, Pierre, TVirginie Debailleul, Luc Gambiez, Karel Geboes, Nadine Ectors, Marie-Paule Delescaut, and Jean-Pierre Aubert. 'Abnormalities in Mucin Gene Expression in Crohn's Disease', n.d., 9.
- Eaden, Abrams, Ekbohm, Jackson, and Mayberry. 'Colorectal Cancer Prevention in Ulcerative Colitis: A Case-Control Study: COLORECTAL CANCER PREVENTION IN ULCERATIVE COLITIS'. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 14, no. 2 (February 2000): 145–53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2000.00698.x>.
- 'Eziopatogenesi Delle Malattie Infiammatorie Intestinali'. <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v12/i30/4807.htm>.
- Fallini, Riccardo. 'Protocollo - Colture Cellulari'. MolecularLab.it. <http://www.molecularlab.it/protocolli/protocol.asp?id=17>.
- . 'Protocollo - Immunocitochimica (ICC)'. MolecularLab.it. <http://www.molecularlab.it/protocolli/protocol.asp?id=22>.
- Fumery, Mathurin, Cao Xiaocang, Luc Dauchet, Corinne Gower-Rousseau, Laurent Peyrin-Biroulet, and Jean-Frédéric Colombel. 'Thromboembolic Events and Cardiovascular Mortality in Inflammatory Bowel Diseases: A Meta-Analysis of Observational Studies'. *Journal of Crohn's and Colitis* 8, no. 6 (June 2014): 469–79. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.09.021>.
- 'Gde-Growdex-Technical-Protocols.Pdf', n.d.
- Guagnozzi, Danila. 'Anemia in Inflammatory Bowel Disease: A Neglected Issue with Relevant Effects'. *World Journal of Gastroenterology* 20, no. 13 (2014): 3542. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i13.3542>.
- Hayashi, Ryuji, Hiroo Wada, Kazuhiro Ito, and Ian M Adcock. 'Effects of Glucocorticoids on Gene Transcription'. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 12.
- Hedin, Charlotte, Kevin Whelan, and James O. Lindsay. 'Evidence for the Use of Probiotics and Prebiotics in Inflammatory Bowel Disease: A Review of Clinical Trials'. *The Proceedings of the Nutrition Society* 66, no. 3 (August 2007): 307–15. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005563>.
- Ji, Xiao-Qing. 'Pulmonary Manifestations of Inflammatory Bowel Disease'. *World Journal of Gastroenterology* 20, no. 37 (2014): 13501. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i37.13501>.
- Kobayashi, Taku, Britta Siegmund, Catherine Le Berre, Shu Chen Wei, Marc Ferrante, Bo Shen, Charles N. Bernstein, Silvio Danese, Laurent Peyrin-Biroulet, and Toshifumi Hibi. 'Ulcerative Colitis'. *Nature Reviews Disease Primers* 6, no. 1 (December 2020): 74. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0205-x>.

- Krug, S M, C Bojarski, A Fromm, I M Lee, P Dames, J F Richter, J R Turner, M Fromm, and J-D Schulzke. 'Tricellulin Is Regulated via Interleukin-13-Receptor A2, Affects Macromolecule Uptake, and Is Decreased in Ulcerative Colitis'. *Mucosal Immunology* 11, no. 2 (March 2018): 345–56. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.52>.
- Krug, Susanne M., Salah Amasheh, Jan F. Richter, Susanne Milatz, Dorothee Günzel, Julie K. Westphal, Otmar Huber, Jörg D. Schulzke, and Michael Fromm. 'Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability'. Edited by Asma Nusrat. *Molecular Biology of the Cell* 20, no. 16 (15 August 2009): 3713–24. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-01-0080>.
- Laukoetter, Mike G., Porfirio Nava, Winston Y. Lee, Eric A. Severson, Christopher T. Capaldo, Brian A. Babbitt, Ifor R. Williams, et al. 'JAM-A Regulates Permeability and Inflammation in the Intestine in Vivo'. *Journal of Experimental Medicine* 204, no. 13 (24 December 2007): 3067–76. <https://doi.org/10.1084/jem.20071416>.
- Lea, Tor. 'Caco-2 Cell Line'. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, edited by Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, and Harry Wichers. Cham (CH): Springer, 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500149/>.
- McDowell, Christopher, Umer Farooq, and Muhammad Haseeb. *Inflammatory Bowel Disease. StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470312/>.
- Mishra, Rangnath, Punita Dhawan, Anand S. Srivastava, and Amar B. Singh. 'Inflammatory Bowel Disease: Therapeutic Limitations and Prospective of the Stem Cell Therapy'. *World Journal of Stem Cells* 12, no. 10 (26 October 2020): 1050–66. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i10.1050>.
- Nusrat, A., J. R. Turner, and J. L. Madara. 'IV. Regulation of Tight Junctions by Extracellular Stimuli: Nutrients, Cytokines, and Immune Cells'. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1 November 2000. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.5.G851>.
- Okumura, Ryu, and Kiyoshi Takeda. 'Roles of Intestinal Epithelial Cells in the Maintenance of Gut Homeostasis'. *Experimental & Molecular Medicine* 49, no. 5 (May 2017): e338–e338. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.20>.
- Ott, S. J., M. Musfeldt, D. F. Wenderoth, J. Hampe, O. Brant, U. R. Fölsch, K. N. Timmis, and S. Schreiber. 'Reduction in Diversity of the Colonic Mucosa Associated Bacterial Microflora in Patients with Active Inflammatory Bowel Disease'. *Gut* 53, no. 5 (May 2004): 685–93. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.025403>.
- 'Preparazione Dei Campioni'. http://www.fluorescencemicroscopy.it/preparazione_dei_campioni.html.
- Punchard, N. A., S. M. Greenfield, and R. P. H. Thompson. 'Mechanism of Action of 5-Arinosalicylic Acid'. *Mediators of Inflammation* 1, no. 3 (1992): 151–65. <https://doi.org/10.1155/S0962935192000243>.
- Rojas-Feria, María. 'Hepatobiliary Manifestations in Inflammatory Bowel Disease: The Gut, the Drugs and the Liver'. *World Journal of Gastroenterology* 19, no. 42 (2013): 7327. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7327>.
- Sandborn, William J., Paul Rutgeerts, Brian G. Feagan, Walter Reinisch, Allan Olson, Jewel Johanns, Jiandong Lu, et al. 'Colectomy Rate Comparison After Treatment of Ulcerative Colitis With Placebo or Infliximab'. *Gastroenterology* 137, no. 4 (October 2009): 1250–60. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.06.061>.
- Shah, Ayesha, Marjorie Walker, Daniel Burger, Neal Martin, Moritz von Wulffen, Natasha Koloski, Mike Jones, Nicholas J. Talley, and Gerald J. Holtmann. 'Link Between Celiac Disease and Inflammatory Bowel

Disease'. *Journal of Clinical Gastroenterology* 53, no. 7 (August 2019): 514–22. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001033>.

Su, Hau-Jyun, Yu-Tse Chiu, Chuan-Tai Chiu, Yen-Chun Lin, Chen-Yu Wang, Jui-Ying Hsieh, and Shu-Chen Wei. 'Inflammatory Bowel Disease and Its Treatment in 2018: Global and Taiwanese Status Updates'. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi* 118, no. 7 (July 2019): 1083–92. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.07.005>.

Sun, Huadong, Edwin Cy Chow, Shanjun Liu, Yimin Du, and K. Sandy Pang. 'The Caco-2 Cell Monolayer: Usefulness and Limitations'. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4, no. 4 (April 2008): 395–411. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.395>.

Suzuki, Takuya. 'Regulation of Intestinal Epithelial Permeability by Tight Junctions'. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, no. 4 (February 2013): 631–59. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>.

Tamura, Atsushi, Hisayoshi Hayashi, Mitsunobu Imasato, Yuji Yamazaki, Asuka Hagiwara, Masami Wada, Tetsuo Noda, Mitsuhiro Watanabe, Yuichi Suzuki, and Sachiko Tsukita. 'Loss of Claudin-15, but Not Claudin-2, Causes Na⁺ Deficiency and Glucose Malabsorption in Mouse Small Intestine'. *Gastroenterology* 140, no. 3 (March 2011): 913–23. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.006>.

Townsend, Cassandra M., Claire E. Parker, John K. MacDonald, Tran M. Nguyen, Vipul Jairath, Brian G. Feagan, and Reena Khanna. 'Antibiotics for Induction and Maintenance of Remission in Crohn's Disease'. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2 (7 February 2019): CD012730. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012730.pub2>.

Tsilingiri, Katerina, Theolis Barbosa, Giuseppe Penna, Flavio Caprioli, Angelica Sonzogni, Giuseppe Viale, and Maria Rescigno. 'Probiotic and Postbiotic Activity in Health and Disease: Comparison on a Novel Polarised Ex-Vivo Organ Culture Model'. *Gut* 61, no. 7 (July 2012): 1007–15. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300971>.

Turner, Jerrold R. 'Intestinal Mucosal Barrier Function in Health and Disease'. *Nature Reviews Immunology* 9, no. 11 (November 2009): 799–809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>.

Van Klinken, B J-W, J-W G Van der Wal, A W C Einerhand, H A Büller, and J Dekker. 'Sulphation and Secretion of the Predominant Secretory Human Colonic Mucin MUC2 in Ulcerative Colitis'. *Gut* 44, no. 3 (1 March 1999): 387–93. <https://doi.org/10.1136/gut.44.3.387>.

Zeissig, S, N Burgel, D Gunzel, J Richter, J Mankertz, U Wahnschaffe, A J Kroesen, M Zeitz, M Fromm, and J-D Schulzke. 'Changes in Expression and Distribution of Claudin 2, 5 and 8 Lead to Discontinuous Tight Junctions and Barrier Dysfunction in Active Crohn's Disease', n.d., 12.

Zhang, Xiao-Feng, Xiao-Xian Guan, Yu-Jun Tang, Jin-Feng Sun, Xiao-Kai Wang, Wei-Dong Wang, and Jian-Ming Fan. 'Clinical Effects and Gut Microbiota Changes of Using Probiotics, Prebiotics or Synbiotics in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *European Journal of Nutrition* 60, no. 5 (1 August 2021): 2855–75. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02503-5>.

Zhang, Yi-Zhen. 'Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis'. *World Journal of Gastroenterology* 20, no. 1 (2014): 91. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>.

