

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE FARMACEUTICHE APPLICATE

TESI DI LAUREA

**La resistenza elettrica transepiteliale come parametro d'integrità
di barriera intestinale *in vitro*: effetto di una combinazione di
sostanze naturali e probiotici**

RELATORE: PROF.SSA MONICA MONTOPOLI

CORRELATORE: DOTT. MATTIA TINAZZI

LAUREANDA: SARTORI ILARIA

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

ABBREVIAZIONI:

5-ASA: Acido 5-aminosalicilico

Abs: Absorbance

ADA: Adalimumab

AJ: Adherens junctions

bTJ: Bicellular tight junctions

CD: Morbo di Crohn

CS: Corticosteroidi

CSs: Recettore dei glucocorticoidi

DNA: Acido deossiribonucleico

EIM: Extraintestinal manifestations

IBD: Inflammatory bowel disease

IFX: Infliximab

IL: Interleuchina

IFN- γ : Interferone- γ

JAM: Junction adhesion molecule

LPS: Lipopolisaccaride

SASP: Sulfasalazina

SP: Sulfapiridina

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	1
1.1. EPITELIO INTESTINALE E PATOLOGIE INFIAMMATORIE ASSOCIATE	1
1.1.1. EPITELIO INTESTINALE E GIUNZIONI TRA CELLULE	1
1.1.2. GIUNZIONI INTESTINALI	5
1.1.2.1. OCCLUDINA	7
1.1.2.2. CLAUDINE	7
1.1.2.3. TRICELLULINA	7
1.1.2.4. LE MOLECOLE DI ADESIONE GIUNZIONALE (JAM)	8
1.1.3. MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI (IBD)	8
1.1.3.1. FATTORI CHE CONTRIBUISCONO ALLO SVILUPPO DELLE IBD	11
1.1.3.2. MORBO DI CROHN E COLITE ULCEROSA	12
1.1.3.3. MANIFESTAZIONI EXTRAINTESTINALI	16
1.2 TRATTAMENTI TRADIZIONALI E INNOVATIVI PER IBD	18
1.2.1. TRATTAMENTO FARMACOLOGICO	18
1.2.1.1. AMINOSALICILATI	19
1.2.1.2. GLUCOCORTICOIDI	20
1.2.1.3. CORTICOSTEROIDI	21
1.2.1.4. FARMACI BIOLOGICI ANTI- TNF-α	21
1.2.1.5. IMMUNOMODULATORI	23
1.2.2. TRATTAMENTI ALTERNATIVI ALLE TERAPIE CONVENZIONALI	23
1.2.2.1. I PROBIOTICI	24
1.2.2.2. I PREBIOTICI	26
1.2.2.3. I SIMBIOTICI	27
2. OBIETTIVI	28
3. MATERIALI E METODI	29
3.1 COLTURE CELLULARI	29
3.1.1. PRODOTTO C	30
3.1.2. PARADIGMI INFIAMMATORI: LPS e TNF-α/ γ	30
3.2. SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE (CRYSTAL VIOLET ASSAY)	31
3.3. MISURAZIONE DELLA RESISTENZA ELETTRICA TRANSEPITELIALE – TEER	32
3.4. SAGGIO DI PERMEABILITÀ PARACELLULARE	33
4. RISULTATI	35
4.1. SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE	35
4.2. MISURAZIONE DELLA RESISTENZA ELETTRICA TRANSEPITELIALE – TEER	36

4.3. PERMEABILITA' CELLULARE	38
5. DISCUSSIONE.....	40
6. BIBLIOGRAFIA.....	43

1. INTRODUZIONE

1.1. EPITELIO INTESTINALE E PATOLOGIE INFIAMMATORIE ASSOCIATE

1.1.1. EPITELIO INTESTINALE E GIUNZIONI TRA CELLULE

L'intestino è l'ultima parte dell'apparato digerente compresa tra il piloro e l'orifizio anale. Ha un ruolo fondamentale nell'assorbimento di sostanze, nutrienti, e nella difesa da agenti patogeni esterni all'organismo. Si presenta come un tubo di diametro variabile con pareti flessibili, ripiegato più volte su sé stesso. Viene distinto in due parti: intestino tenue e intestino crasso (*Fig.1*).

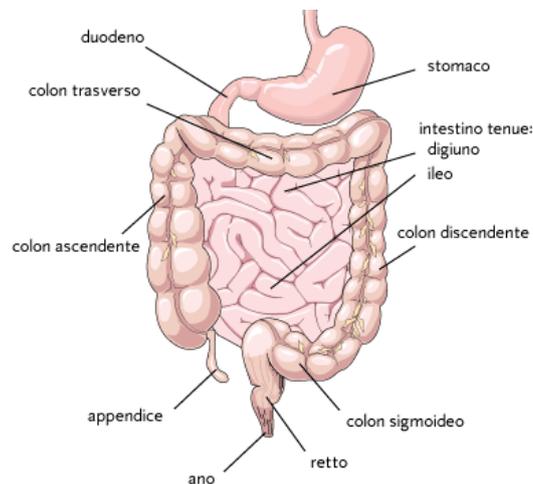


Figura 1. Rappresentazione dell'intestino tenue e crasso.

L'intestino crasso rappresenta la parte terminale del tubo digerente, e si estende dalla valvola ileo-cecale all'ano. Il suo epitelio, come il tenue, è composto da cellule caliciformi mucipare ed enterociti cilindrici semplici o monostratificati.

Il suo compito è di assorbire acqua ed elettroliti, oltre ad alcune vitamine prodotte dalla flora batterica: provvede quindi ad accumulare, degradare, e spingere gli scarti non digeribili verso il retto e li espelle dall'organismo attraverso il canale anale.

L'intestino tenue ha un ruolo cruciale nella digestione in quanto consente la scomposizione e l'assorbimento di importanti nutrienti. L'epitelio superficiale del tenue è di tipo colonnare o

cilindrico semplice ed è costituito principalmente da due tipologie di cellule, ovvero gli enterociti, e semplici cellule epiteliali colonnari che svolgono un ruolo importante nell'assorbimento dei nutrienti (ad esempio ioni, acqua, zucchero, peptidi e lipidi) e nella secrezione di immunoglobuline, e le cellule caliciformi mucipare, le quali secernono muco, che lubrifica il passaggio del cibo attraverso l'intestino e protegge la parete intestinale dagli enzimi digestivi.

Sono presenti inoltre cellule enteroendocrine (*Kong, Zhang, e Zhang 2018*).

Il tenue viene diviso in tre parti: duodeno, digiuno e ileo.

La regione più corta è il duodeno: misura in media dai 20/25 cm di lunghezza e la sua larghezza è di 47mm; ha inizio dallo sfintere pilorico. Appena oltre lo sfintere pilorico, si piega posteriormente dietro il peritoneo, diventando retroperitoneale, e poi forma una curva a C attorno alla testa del pancreas prima di risalire anteriormente per tornare alla cavità peritoneale e unirsi al digiuno. Riceve il chimo dallo stomaco, gli enzimi pancreatici e la bile dal fegato. In questa parte dell'intestino sono presenti le ghiandole di Brunner, che secernono un muco alcalino. Il digiuno è la sezione centrale dell'intestino tenue, ha un diametro di 3/3,5 cm ed è lungo 2,5 metri, contiene pliche circolari (lombi muscolari) e villi per assorbire i prodotti della digestione. L'ileo è la parte finale del tenue, misura circa 3 metri e termina nel cieco. È più spesso, più vascolarizzato e presenta pliche mucose più sviluppate rispetto al digiuno. Qui avviene l'assorbimento di tutti i nutrienti finali, con i principali prodotti che sono la vitamina B12 e gli acidi biliari («*Collins, Nguyen, and Badireddy, 'Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine'*» 2022).

La parete dell'intestino tenue è composta da quattro strati principali: tonaca sierosa, tonaca muscolare, sottomucosa e mucosa. La tonaca sierosa è lo strato esterno del tenue costituita da mesotelio ed epitelio, essa va a circondare il digiuno e l'ileo e la superficie anteriore del duodeno. La tonaca muscolare è composta da due strati di muscolatura liscia, strato longitudinale esterno che accorcia e allunga l'intestino, e uno strato circolare interno più spesso di muscolatura liscia, il quale provoca costrizione. I nervi si trovano tra questi due strati permettendogli di lavorare assieme al fine di propagare il cibo in direzione da prossimale a distale.

La tonaca sottomucosa è costituita da uno strato di tessuto connettivo che contiene i vasi sanguigni, i nervi e i vasi linfatici.

La tonaca mucosa infine è lo strato più interno, e istologicamente risulta divisa in tre strati: un epitelio di rivestimento (d'aspetto variabile a seconda dei tratti), una lamina propria connettivale di supporto e un sottile strato di muscolatura liscia o *muscularis mucosae*. («Collins, Nguyen, and Badireddy, 'Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine'» 2022).

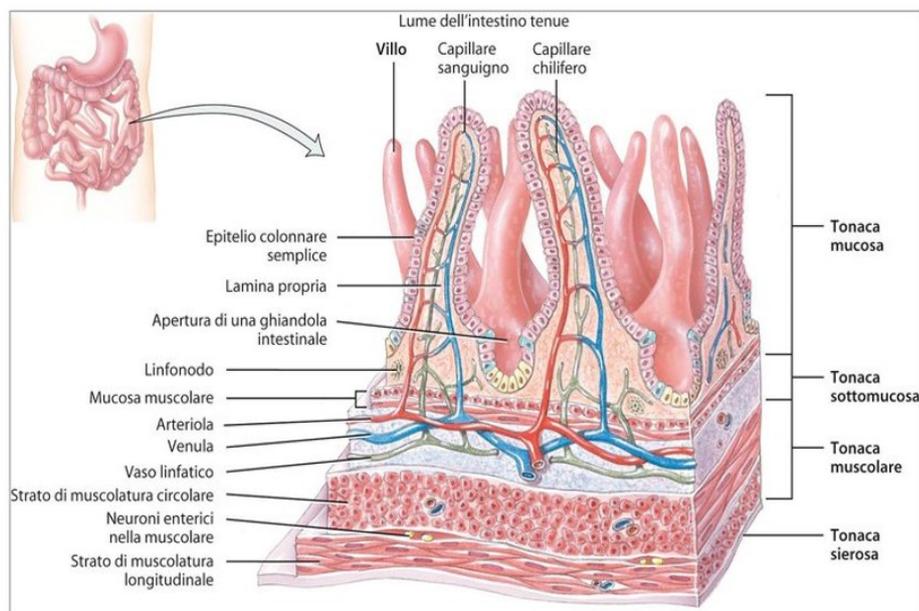


Figura 2. Lume dell'intestino tenue

La superficie interna del tenue è sollevata in pieghe, le quali presentano estroflessioni digitiformi chiamate villi. Ogni villo è composto da un asse connettivale tappezzato da un singolo strato di enterociti (cellule assorbenti), la cui membrana presenta delle sottili estroflessioni; i microvilli che si trovano nella superficie libera nel loro insieme formano l'orletto a spazzola.

Nei solchi disposti tra i villi si trovano le ghiandole di Galeazzi (o cripte di Lieberkühn) invaginazioni situate nello spessore della lamina propria che, si propagano in profondità nel tessuto connettivo sottostante: esse sono ubicate nell'intestino tenue e sparse anche nel crasso. Il compito delle ghiandole è quello di secernere succo enteroepatico, composto da acqua, elettroliti, muco ed enzimi. Le cripte rappresentano l'unità funzionale dell'intestino e, sono costituite da numerose tipologie cellulari, come enterociti, cellule caliciformi mucipare, cellule del Paneth (generano lisozima con proprietà antibatteriche) e cellule enterocromaffini, e (cellule staminali) per il rinnovo dell'epitelio di rivestimento («*Mucosa intestinale - villi intestinali*»).

La barriera intestinale costituisce l'interfaccia tra l'ambiente esterno e l'ambiente interno del corpo. Una barriera intestinale funzionale consente l'assorbimento di nutrienti e fluidi, ma allo

stesso tempo previene l'ingresso di sostanze nocive come tossine e batteri attraversando l'epitelio intestinale e raggiungendo il corpo.

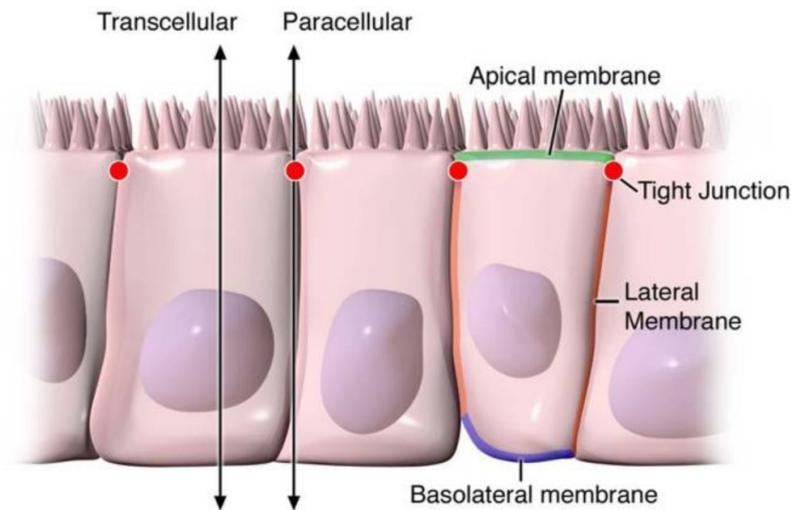


Figura 3. Vie di permeabilità intestinale

La permeabilità intestinale è il passaggio di un soluto attraverso una semplice membrana e può essere misurato mediante registrazione il passaggio di marcatori di permeabilità sull'epitelio attraverso il percorso paracellulare o transcellulare.

Le superfici mucose dell'intestino sono rivestite da cellule epiteliali, le quali costituiscono la barriera intestinale. Al contempo, le mucose consentono l'assorbimento di nutrienti, liquidi e agenti farmacologici, impedendo inoltre alle sostanze nocive come tossine e batteri di attraversare l'epitelio e raggiungere il sistema circolatorio (Turner 2009). L'epitelio intestinale, oltre a essere responsabile dell'assorbimento dei nutrienti, regola anche l'omeostasi di acqua e ioni e funge da barriera protettiva per impedire ai patogeni, che arrivano nel lume intestinale, di superare la barriera epiteliale e provocare infiammazioni della mucosa.

L'assorbimento di sostanze può essere influenzato dalla permeabilità intestinale, cioè dal passaggio di molecole idrofile di medie dimensioni che avviene verso un gradiente di concentrazione senza l'assistenza di un sistema di trasporto; una permeabilità alterata può portare all'insorgenza di varie condizioni croniche di origine gastrointestinale e non, come Alzheimer e il morbo di Parkinson.

Per mantenere la barriera intestinale in equilibrio e un'integrità ottimale esistono meccanismi di difesa fisici che includono sia i complessi giunzionali che collegano le cellule epiteliali adiacenti sia la superficie mucosa del rivestimento delle cellule epiteliali (Schoultz e Keita 2020).

1.1.2. GIUNZIONI INTESTINALI

L'epitelio intestinale rappresenta la più ampia area del corpo in contatto con l'ambiente. Esso è costituito dagli enterociti, cellule fondamentali deputate all'assorbimento nutritivo e, dotate di una membrana cellulare permeabile a composti lipofili, ma non a composti idrofili senza specifici trasportatori. L'epitelio intestinale, oltre a essere responsabile dell'assorbimento dei nutrienti, regola anche l'omeostasi di acqua e ioni e funge da barriera protettiva per impedire ai patogeni, che arrivano nel lume intestinale, di superare la barriera epiteliale e provocare infiammazioni della mucosa. In condizioni fisiologiche, le cellule sono connesse da due principali tipi di giunzioni intercellulari, le giunzioni serrate (tight junctions, TJ) e le giunzioni aderenti (adherens junctions, AJ), che regolano la permeabilità paracellulare. Nelle barriere epiteliali, le TJ e le AJ sono ben definite e distribuite, in particolare: le TJ sono ubicate nella parte apicale, mentre le AJ sono localizzate nella parte basolaterale (Fig. 4).

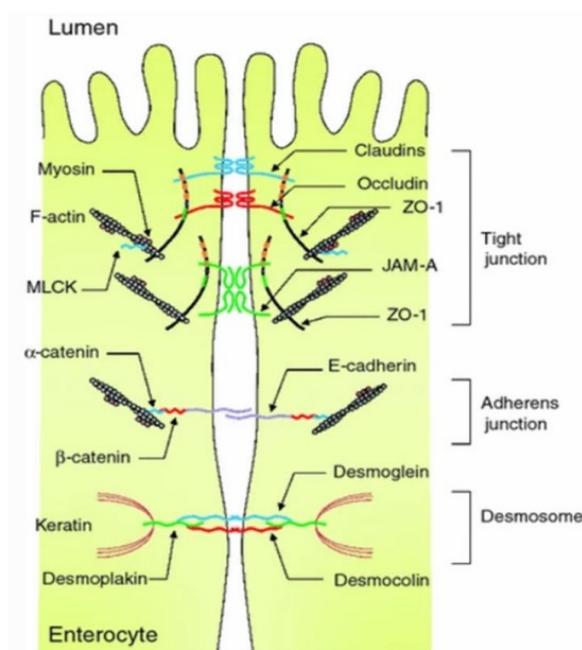


Figura 4. Struttura molecolare della giunzione intercellulare (T Suzuki 2013)

Entrambi i complessi giunzionali sono connessi al citoscheletro di actina.

Le giunzioni aderenti (AJ) sono un'associazione complessa tra molteplici componenti, giocano un ruolo centrale nella formazione dei contatti tra cellule vicine e nella stabilizzazione dell'adesione (Hermiston e Gordon 1995).

Le caderine sono componenti delle AJ e sono proteine con un segmento transmembrana e 5 domini extracellulari ripetuti che mediano, attraverso interazioni omofile, l'adesione

cellulare Ca^{2+} -dipendente tra cellule adiacenti. Esistono diverse isoforme di caderina: E- (epiteliale), VE- (endotelio vascolare), N- (neurale), P- (placentare) e R- (retina). La E-caderina (conosciuta anche come caderina-1) è quella maggiormente distribuita nei tessuti epiteliali, mentre la VE-caderina è espressa per lo più nelle cellule endoteliali (Gooding, Yap, e Ikura 2004; Hartsock e Nelson 2008). La coda citoplasmatica di E-caderina interagisce direttamente con la catenina $\delta 1$ (p120 catenina) e con la β -catenina. A sua volta, la β -catenina si lega all' α -catenina 1 che regola l'assemblaggio dell'actina locale e contribuisce allo sviluppo dell'anello perigiunzionale acto-miosinico (Turner 2009).

Le giunzioni strette (tight junctions) sono le principali responsabili delle proprietà di barriera epiteliale ed endoteliale. Tali giunzioni sigillano lo spazio intercellulare presente tra le cellule epiteliali, sono composte da sottili complessi proteici che circondano completamente l'apice della cellula. Queste giunzioni isolano il dominio apicale inibendo la diffusione di liquidi e proteine attraverso il doppio strato fosfolipidico.

Il complesso della giunzione stretta, più in dettaglio, è costituito da proteine transmembrana tra cui occludina, claudine, tricellulina, e molecole di adesione giunzionale.

Sono presenti tre proteine transmembrana comuni a tutte le TJ: Claudine, proteine della famiglia TAMP e molecole di adesione giunzionale (JAM). La famiglia delle claudine regola la permesibilità di barriere specifiche. Le proteine della famiglia TAMP, che comprendono le proteine del dominio MARVEL, occludina e tricellulina, sono proteine che attraversano la tetramembrana e regolano il reclutamento di proteine di segnalazione alle TJ. JAM -A, -B, -C, svolgono invece ruoli importanti nella formazione della barriera e nella segnalazione alle cellule circolanti (Vermette et al. 2018).

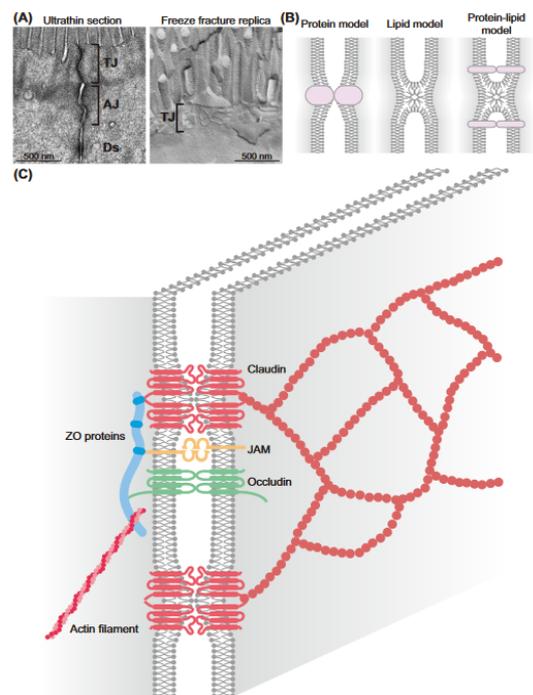


Figura 5. Morfologia TJ osservata mediante

1.1.2.1. OCCLUDINA

L'occludina è una proteina con quattro domini transmembrana, due anelli extracellulari e tre domini citoplasmatici extracellulari ed esistono in 2 isoforme (N- e C- terminale). Il dominio C-terminale, localizzato nel citoplasma, si lega direttamente a ZO-1 (zonula occludens) che lega a sua volta il citoscheletro di actina. Questa porzione di occludina è ricca di siti di fosforilazione (tiroxina, serina e treonina) che possono essere modificati dalle chinasi e dalle fosfatasi. L'occludina non fosforilata è distribuita nella membrana basolaterale e nelle vescicole citoplasmatiche, mentre l'occludina fosforilata è localizzata nelle TJ e determina una ridotta permeabilità paracellulare (*Schneeberger e Lynch 2004*).

1.1.2.2. CLAUDINE

Le claudine sono proteine costituite da un N-terminale citoplasmatico corto, due anse extracellulari e un dominio C-terminale. La famiglia delle claudine è composta da 24 isoforme che determinano la selettività della via paracellulare in termini di carica e dimensione (*H Chiba 2008*). È stato dimostrato che le claudine -1, -3, -4, -5, -8, -11, -14 e -19 giocano un ruolo fondamentale per la selettività di barriera paracellulare (*Krause et al. 2008*). La permeabilità degli ioni attraverso le TJ è mediata dalle claudine -4, -8 e -14 coinvolte nella barriera cationica, mentre le claudine -2, -7 e -13 vanno a formare i pori paracellulari per il passaggio di cationi e anioni.

Nel tratto gastrointestinale sono presenti le claudine -2, -3, -4, -7, -8, -12 e -15, ma i livelli di espressione e la loro localizzazione subcellulare sono diversi nei segmenti intestinali (*H Chiba 2008*).

1.1.2.3. TRICELLULINA

Questa proteina appartiene alla famiglia TAMP che attraversa la tetramembrana. Presenta quattro domini transmembrana, due anse extracellulari e grandi domini citoplasmatici ammino e carbossi- terminali. Il dominio carbossi-terminale nella tricellulina si lega a ZO-1. La tricellulina è coinvolta nelle giunzioni bicellulari (bTJ) e in quelle tricellulari (tTJ). I risultati ottenuti da un recente studio evidenziano come la bassa espressione della tricellulina permetta il passaggio di macromolecole; invece, a più elevata espressione, essa porta alla formazione di una barriera per le macromolecole nelle tTJ e una barriera per soluti di ogni dimensione nelle

bTJ (*Susanne M. Krug 2009*). Inoltre, le proprietà di barriera differiscono a seconda della localizzazione della tricellulina. La localizzazione bicellulare diminuisce la permeabilità di ioni e soluti, mentre la localizzazione tricellulare non ha alcun effetto sulla permeabilità ionica, ma diminuisce la permeabilità a soluti più grandi. In genere, le proteine di membrana che costituiscono i complessi giunzionali interagiscono con le proteine della zona occludens (ZO), proteine multi-dominio necessarie per la regolazione e il mantenimento della struttura delle TJ (*Suzuki 2013*).

1.1.2.4. LE MOLECOLE DI ADESIONE GIUNZIONALE (JAM)

Le JAM contengono un segmento transmembrana e un dominio extracellulare. Esse sono proteine coinvolte nell'adesione tra le cellule della barriera e tra la barriera e le cellule del sangue, (*Chiba 2008*; «*Structural organization of the tight junctions*») possono formare interazioni omofiliche ed eterofiliche con diversi ligandi, tra cui le integrine. Inoltre, possono interagire con ZO-1 e il recettore proteasi-attivato PAR-3 (*Chiba et al. 2008*).

Le proteine periferiche di membrana ZO sono necessarie per l'assemblaggio e il mantenimento delle TJ, perché possiedono domini multipli per l'interazione con altre proteine, incluse le proteine integrali di membrana e l'actina. Nel lato intracellulare della membrana, le estremità carbossi-terminali di claudina, occludina e actina vanno ad interagire con le proteine ZO-1, ZO-2 e ZO-3. Il complesso multiproteico delle TJ è legato alle proteine integrali di membrana con il dominio N-terminale e al citoscheletro di actina con il dominio C-terminale. Le proteine ZO-1 collega direttamente e indirettamente le proteine integrali di membrana (occludine e claudine) alle altre proteine citoplasmatiche delle TJ e al citoscheletro di actina («*The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton*» 1998).

1.1.3. MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI (IBD)

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD, Inflammatory Bowel Disease) sono caratterizzate da un'inflammatione cronica del tratto gastrointestinale associata a uno squilibrio del microbiota intestinale. Il loro decorso è altalenante, dove fasi di quiescenza di variabile durata sono interrotte da episodi di riacutizzazione.

Le IBD sono correlate a uno squilibrio immunologico della mucosa intestinale, principalmente associato a disfunzionalità delle cellule del sistema immunitario adattivo, che rispondono contro antigeni *self* producendo condizioni infiammatorie croniche. Le malattie infiammatorie più studiate sono la colite ulcerosa (CU) e la malattia di Crohn (CD), caratterizzate dalla più alta prevalenza nella popolazione mondiale (*de Mattos et al. 2015*).

L'infiammazione della mucosa intestinale nell'IBD è caratterizzata da episodi di dolore addominale, diarrea, feci sanguinolente, perdita di peso e afflusso di neutrofili, macrofagi e altre cellule immunitarie che producono citochine, enzimi proteolitici e radicali liberi che provocano infiammazione e ulcerazione.

Le cause di IBD sono diverse: studi hanno dimostrato che la loro insorgenza è associata alla suscettibilità genetica dell'ospite, al microbiota intestinale, a fattori ambientali e ad anomalie immunologiche.

Anche situazioni di disagio psichico, come ansia e depressione, possono essere coinvolte.

L'epitelio intestinale impedisce l'ingresso di batteri o antigeni nella circolazione mediante i complessi giunzionali precedentemente citati. Nelle IBD, queste giunzioni sono difettose, e la loro alterazione è responsabile della successiva infiammazione. I meccanismi protettivi includono anche la produzione di muco da parte delle cellule caliciformi e la secrezione delle cellule di Paneth di α -defensine con attività antimicrobica intrinseca. Le reazioni infiammatorie eccessive possono portare a un deterioramento dell'epitelio e ad un'ulteriore esposizione a microbi intestinali, causando così un peggioramento dell'infiammazione stessa (*McDowell, Farooq, e Haseeb 2022*).

Le IBD sono tipicamente diagnosticate tra i 18 e i 35 anni (sebbene negli ultimi anni è stato registrato un incremento del numero di casi in fascia d'età pediatrica) ed hanno un impatto negativo sullo stato di salute generale, sulla salute mentale e sul funzionamento sociale degli individui.

Alcuni studi evidenziano che nel Nord America e in Europa il tasso di incidenza annuo della malattia di Crohn è di 5-6 casi su 100.000 persone, per la colite ulcerosa 6-15 casi su 100.000 persone; la prevalenza è 27-106 casi su 100.000 per il morbo di Crohn, 80-105 su 100.000 per la colite ulcerosa. L'epidemiologia delle malattie infiammatorie croniche intestinali sta subendo un profondo cambiamento: si è riscontrato un significativo incremento di incidenza in etnie e nazioni dove tali patologie erano poco comuni (Sud America, Europa dell'est, Asia, Africa) a fronte di una stabilizzazione o perfino un decremento in Nord America ed Europa; nonostante tale riduzione in alcune aree, gli studi di prevalenza mostrano un incremento globale. Fattori etnici e razziali condizionano il rischio di sviluppare una malattia, ma è significativo anche

l'impatto dell'occidentalizzazione delle abitudini e degli stili di vita (*Windsor e Kaplan 2019; Ng et al. 2017*).

Da inizio anni 2000, si rileva un significativo e costante incremento delle IBD non solo nelle aree geografiche storicamente associate a tali patologie, ma anche in quelle caratterizzate da elevata industrializzazione (Nord Europa, Regno Unito e America del nord) si evidenzia una diffusione sempre più globale dello stato morboso e un ruolo critico nella patogenesi attribuito con maggiore forza ai trigger ambientali (*Danese, Sans, e Fiocchi 2004*).



Figura 6. Prevalenza mondiale delle IBD

L'aumento dell'incidenza è marcato anche nei paesi mediterranei, a causa del cambiamento delle abitudini alimentari: in Italia i dati relativi alla prevalenza delle IBD sono intorno alle 250mila persone affette, con un'incidenza di circa 10.5 nuovi casi/anno per 100.000 abitanti.

In aumento sono i casi in età pediatrica (circa il 20% di essi interessa bambini e adolescenti sotto i 20 anni (*Kuenzig et al. 2022; Sýkora et al. 2018*) e in fasce di popolazioni prima interessate solo in modo marginale, come nei soggetti con più di 60 anni.

La CD si manifesta, molto più frequentemente nelle donne, anche se è stata osservata una predominanza maschile in età pediatrica (*Gasparetto e Guariso 2013*); per la UC in alcune popolazioni è stata rilevata invece una lieve predominanza nel genere maschile (*Monteleone et al. 2006; Kaser, Zeissig, e Blumberg 2010*).

1.1.3.1. FATTORI CHE CONTRIBUISCONO ALLO SVILUPPO DELLE IBD

L'eziologia delle IBD non è del tutto chiara: è stato dimostrato che nella patogenesi concorrono elementi di predisposizione genetica, di disregolazione del sistema immunitario e disbiosi intestinale, in associazione con stimoli antigenici e ossidativi (Yeshi et al. 2020) che agirebbero a livello gastrointestinale, determinando così lo sviluppo dell'inflammatione cronica (fig. 7)

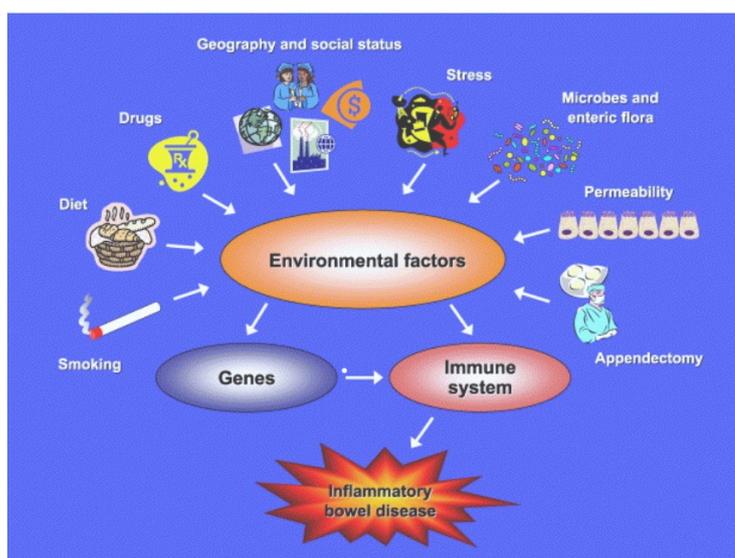


Figura 7. Fattori che contribuiscono all'eziologia delle IBD

- *dieta*: l'associazione tra alimentazione e IBD è stata molto studiata (Oliveira e Monteiro 2017). I grassi alimentari svolgono un ruolo nella patogenesi: si è visto che pazienti occidentali presentano un'incidenza più alta di IBD, in quanto consumano molti cibi fast-food e zuccheri e assumono meno frutta, verdure e fibre. È stato riportato che l'assunzione elevata di grassi è associata all'aumento di incidenza di CU, mentre il consumo di frutta, verdura e fibre sembra in generale ridurre il rischio di IBD. Anche gli additivi alimentari artificiali, prevalenti nelle diete occidentali, possono contribuire a causare l'inflammatione intestinale interferendo con la funzione di barriera dell'intestino (Lamb et al. 2019).
- *predisposizione genetica*: negli Stati Uniti la prevalenza di IBD interessa maggiormente la popolazione afroamericana e caucasica, rispetto agli ispanici ed asiatici. Il rischio di sviluppo di IBD varia dal 7 al 30% per i membri di una stessa famiglia e un'incidenza più alta della patologia viene riscontrata nei gemelli omozigoti (58%), rispetto agli eterozigoti (Ho et al. 2019).

- *fattori ambientali*: in soggetti geneticamente predisposti, uno o più fattori ambientali possono rompere l'equilibrio tra l'immunità mucosale e la flora batterica intestinale. Gli antibiotici possono dare effetti diffusi sulla flora intestinale e produrre una disbiosi che, a sua volta, può causare l'infiammazione intestinale. Secondo dati clinici e sperimentali, la composizione del microbiota nelle IBD è alterata rispetto a quella dei soggetti sani, con conseguente alterazione della funzionalità della barriera intestinale e del sistema immunitario ad essa associato. Un altro esempio dell'influenza dell'ambiente sull'IBD è l'uso del tabacco, in particolare il fumo di sigaretta. Il fumo sembra peggiorare la patogenesi di CD mentre risulta avere un ruolo protettivo contro la colite ulcerosa (*Bamias et al. 2005; Sartor 2006*).
- *stress ossidativo*: lo stress ossidativo (ox-S) è considerato un potenziale fattore eziologico per le IBD in quanto sembrerebbe che lo stato infiammatorio cronico e l'iperattività del sistema immunitario, siano accompagnati da una elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e da una diminuzione delle difese antiossidanti.

1.1.3.2. MORBO DI CROHN E COLITE ULCEROSA

Il morbo di Chron (MC) affligge più frequentemente il tratto terminale del piccolo intestino (ileo) e la porzione iniziale del colon (cieco), ma può colpire ogni parte del tratto gastrointestinale dalla bocca all'ano. Il MC si può presentare con una distribuzione "a chiazze", colpendo alcune aree di intestino, e l'infiammazione può estendersi a tutti gli strati della parete intestinale, compresa l'area attorno al canale anale (*Pucciarelli 2022*).

Il gastroenterologo americano Burril B. Crohn nel 1932 diede il nome alla malattia, descrivendo una serie di pazienti che manifestavano uno stato infiammatorio a livello dell'ileo. Crohn, assieme ai suoi collaboratori, osservarono nei loro pazienti una comunanza delle lesioni del tessuto sia a livello intestinale che in altre parti dell'apparato digerente. Dagli studi e dalle varie osservazioni effettuate fu definita la prima definizione della malattia: il MC è un'infiammazione che può coinvolgere qualsiasi tratto gastrointestinale, dalla bocca all'ano, e può interessare sia la mucosa che gli strati profondi della barriera gastrointestinale (infiammazione transmurale) (*Uhlig 2013*). Le alterazioni da esso provocate derivano da un'inappropriata e continua attivazione del sistema immunitario della mucosa intestinale.

L'inflammation intermittente è probabilmente una conseguenza dovuta a un difetto della barriera mucosale con conseguente disregolazione dei meccanismi dell'immunità sia innata che acquisita.

Nella maggior parte dei casi la malattia compare con dolore addominale, diarrea e riduzione dell'appetito: le manifestazioni che si osservano in questa malattia sono prevalentemente intestinali, ma bisogna ricordare anche gli aspetti sistemici e i sintomi extra-intestinali. A livello della mucosa si possono presentare ascessi, fistole, stenosi, masse addominali e occlusioni. Le manifestazioni sistemiche comprendono febbre, dolori addominali, diarrea anche ematica, vomito e perdita di peso. I sintomi extra-intestinali possono invece verificarsi a carico dell'occhio (uveite), della pelle (eritema nodoso, ipoderma gangrenoso), del sangue, del sistema endocrino e delle articolazioni (artrite). I soggetti affetti da MC possono alternare periodi di acutizzazione e periodi di remissione dei sintomi. Il rischio di sviluppare carcinoma è basso, ma deve essere preso in considerazione in situazioni di casi familiari per tumore intestinale, presenza di pseudopolipi, infiammazione persistente e sindrome dell'intestino corto (*Baumgart e Sandborn 2012*).

Guardando le caratteristiche microscopiche e istologiche, il MC si manifesta come reazione granulomatosa e recidivante, caratterizzata da un ricco infiltrato macrofagico, cellule epitelioidi e cellule giganti multinucleate a tutto spessore. Un'inflammation di tipo granulomatoso è dovuta ad una difficoltà del sistema immunitario di debellare l'agente patogeno, o per una relativa resistenza dell'agente esterno o per un difetto stesso dell'immunità. La mucosa colpita presenta lesioni (ulcere aftoidi) che si localizzano all'altezza delle placche di Peyer, a livello dell'ileo e all'interno di follicoli linfoidi del colon. Queste ulcerazioni possono essere più o meno profonde ed estese, e si alternano a zone di mucosa sana.

Se non curate possono portare a complicanze come stenosi (ristringimenti intestinali) o addirittura fistole (perforazioni) che in alcuni casi richiedono l'intervento chirurgico.

La colite ulcerosa (CU) è una patologia limitata al colon e retto. L'inflammation è tipicamente circoscritta dalla mucosa, e causa un danno superficiale alla parete intestinale. Generalmente la malattia parte dal retto e tende a propagarsi attraverso il colon in maniera continua (*Pucciarelli 2022*).

È un'affezione recidivante acuta e cronica ad eziologia multifattoriale, caratterizzata da diffuse ulcerazioni flogistiche della mucosa colica che si distribuiscono in maniera continua ed uniforme senza interposizione di aree di mucosa normale come invece avviene nel MC. Le

numero ridotto e contengono meno mucina. Alcuni 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 andare ad alterare la funzione di barriera modificando così la funzione e l'espressione delle proteine TJ.

Nei pazienti con CU la tricellulina risulta essere sotto regolata da IL-13, causando così un aumento dell'assorbimento paracellulare di macromolecole e l'infiammazione della mucosa intestinale (*S. M. Krug et al. 2018*).

1.1.3.3. MANIFESTAZIONI EXTRAINTESTINALI

Le IBD possono essere complicate dalla comparsa di manifestazioni extraintestinali. Queste complicanze si possono manifestare nel 6.2% dei pazienti; inoltre, solo in una piccola parte di pazienti possono comparire più di una manifestazione extraintestinale (*Levine e Burakoff 2011*). La loro comparsa può precedere o accompagnare l'esordio della malattia, ma possono comparire anche dopo un lungo periodo successivo all'esordio della malattia stessa. Possono esserci due tipi di manifestazioni: alcune strettamente associate all'attività infiammatoria della malattia a livello intestinale, altre invece acquisiscono un andamento indipendente.

Le sedi interessate sono le articolazioni, la cute, gli occhi, le vie biliari e l'apparato scheletrico. La maggior parte delle alterazioni si presenta nei pazienti dove la malattia infiammatoria è estesa (*Monsén 1990*).

- *Manifestazioni muscoloscheletriche*

Queste manifestazioni sono le più comuni complicanze extraintestinali delle IBD e, si verificano in circa il 40% dei pazienti. Esistono più forme di coinvolgimento articolare, ad esempio l'artropatia periferica, che è un'artrite migrante non erosiva e non deforme che coinvolge prevalentemente l'articolazione del ginocchio e della caviglia in modo asimmetrico (*Sheth, Pitchumoni, e Das 2014*). L'artropatia periferica può essere di due forme: pauciarticolare (coinvolgimento di massimo 5 articolazioni) strettamente correlata all'attività della malattia a livello intestinale, e una poliarticolare (coinvolge più di 5 articolazioni) che presenta un andamento più severo ed indipendente (*T. R. Orchard, Wordsworth, e Jewell 1998*).

Può essere coinvolto anche l'apparato muscolo-scheletrico assiale: l'artropatia assiale include *sacroileite* e spondilite *anchilosante*. L'esordio della spondilite anchilosante associata alle IBD è in giovane età, con dolori alla colonna vertebrale che sono accentuati dal riposo e possono essere associati a rigidità mattutina. Il suo decorso è progressivo, spesso indipendente dalla IBD, e può condurre a danni scheletrici permanenti fino all'anchilosi (*Calin et al. 1977*).

- *Manifestazioni cutanee e mucose*

Le manifestazioni cutanee principali nelle IBD sono l'eritema nodoso (EN) e il pioderma gangrenoso (PG). Il primo si manifesta frequentemente in concomitanza delle

fasi acute della malattia, con delle lesioni nodulari rosse, dolenti, calde che compaiono usualmente sulla superficie estensoria degli arti inferiori. Possono presentarsi anche sintomi sistemici come febbre, l'astenia e l'artralgia.

Il PG compare con una lesione cutanea eritematosa e dolente successivamente evolve con la formazione di una pustola che si ulcera ed è caratterizzata da una regione centrale necrotica. Anch'essa si localizza negli arti inferiori ma è possibile ritrovarla anche in altre zone. A differenza dell'EN, il PG lascia vistose cicatrici alla scomparsa.

- *Manifestazioni epatobiliari*

La più importante tra le manifestazioni epatobiliari è la colangite sclerosante primitiva (CSP), la quale si manifesta nell' 80-90% dei pazienti con IBD. La prevalenza è del 5% in pazienti affetti da CU mentre molto più frequente in pazienti affetti da MC. L'evoluzione della CSP può essere quella di una cirrosi biliare o di un colangiocarcinoma (il rischio è del 10-15%) (*Saich e Chapman 2008*). Inoltre, si è osservato un aumentato rischio di adenocarcinoma del colon nei pazienti affetti da CSP (*Brentnall et al. 1996*).

- *Manifestazioni oculari*

Le manifestazioni oculari principali sono l'*uveite* più frequente nei pazienti affetti da CU e l'*episclerite*, più frequente nei pazienti affetti da MC. L'*uveite* si manifesta con un dolore oculare, arrossamento, fotofobia e offuscamento alla vista, ed è una condizione associata alla positività dell'HLA B27 (antigene leucocitario umano) e alla presenza di manifestazioni extraintestinali come l'eritema nodoso (*Timothy R. Orchard et al. 2002*).

L'*episclerite* è invece un'iperemia della sclera e della congiuntiva, non provoca dolore e alterazioni alla vista (*Williams, Walker, e Orchard 2008*).

- *Manifestazioni trombotiche*

Le IBD sono anche associate alle alterazioni ematologiche, in particolare all'aumento del rischio di trombosi venosa e arteriosa (*Goh 2017*). Uno studio svolto su una popolazione canadese riporta che in pazienti affetti da IBD il rischio di sviluppare trombosi venosa profonda o embolia polmonare è tre volte maggiore rispetto ad individui sani, soprattutto per i pazienti con MC (*Bernstein 2001*).

1.2 TRATTAMENTI TRADIZIONALI E INNOVATIVI PER IBD

1.2.1. TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

Gli obiettivi da raggiungere nel trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinali sono tre:

- Indurre la remissione dei sintomi, come diarrea, dolore addominale, sanguinamento rettale e febbre, e ridurre l'infiammazione, promuovendo la riparazione del danno a livello tissutale.
- Prevenire le complicanze, quali stenosi o fistole. In questo caso è importante l'integrazione con l'intervento chirurgico.

La scelta del trattamento deve considerare le caratteristiche della malattia, in termini di frequenza, estensione e gravità della stessa, le possibili manifestazioni extraintestinali e le complicanze, ma anche bilanciare il rischio correlato agli effetti collaterali delle terapie proposte (*Sales-Campos 2014*).

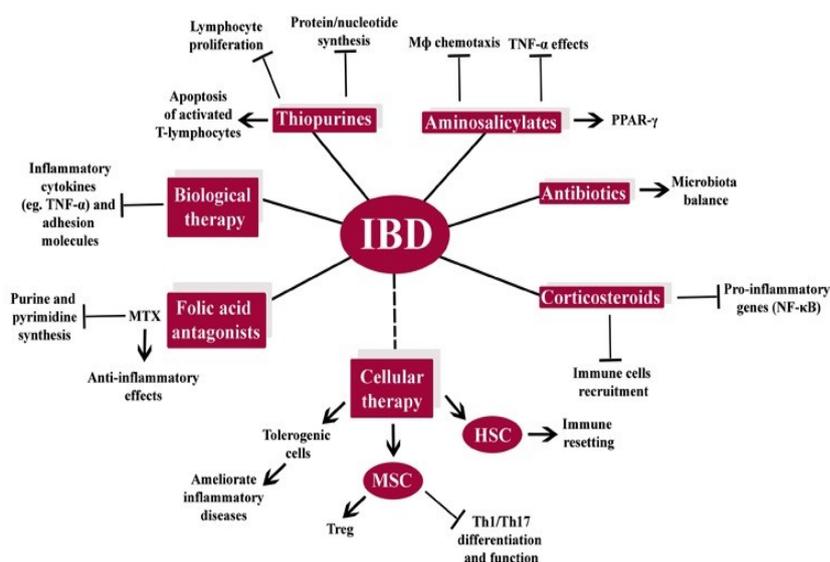


Figura 9. Terapie attuali ed emergenti per le malattie infiammatorie intestinali (IBD) (Sales-Campos 2014)

La complessa eziologia delle IBD costituisce un fattore limitante nella scoperta di nuove terapie farmacologiche e complementari, e nello sviluppo di strategie preventive utili a definire un protocollo generale di trattamento e gestione definitiva dei pazienti con IBD. Gli aspetti

multifattoriali dell'IBD spiegano l'alta frequenza di pazienti resistenti ai trattamenti farmacologici attuali, inclusi farmaci convenzionali come aminosalicilati, glucocorticoidi, immunosoppressori e terapie biologiche basate su anticorpi monoclonali. L'attuale trattamento farmacologico si basa sul sollievo o sulla creazione di un periodo di profonda remissione dei sintomi. Tuttavia, l'utilizzo a lungo termine di questi farmaci può causare gravi effetti collaterali, riducendo la responsività del paziente al trattamento farmacologico.

I fattori di rischio delle IBD non agiscono isolatamente, ma includono fattori di rischio intrinseci ed estrinseci. Fattori intrinseci riguardano la predisposizione genetica e la storia familiare così come il microbiota intestinale, mentre i fattori estrinseci includono il fumo, l'appendicectomia, l'igiene, le infezioni, l'uso di antibiotici e di altri farmaci come i FANS (farmaci antinfiammatori non steroidei) e i contraccettivi orali, una dieta con molti grassi e poche fibre, carenza di vitamina D, stress elevato, privazione del sonno e attività fisica ridotta.

1.2.1.1. AMINOSALICILATI

Farmaci contenenti acido 5-aminosalicilico (5-ASA), sono disponibili diversi preparati che permettono di far arrivare l'acido aminosalicilico attivo ai segmenti dell'intestino tenue e del colon: sulfasalazina (5-ASA + sulfapiridina), olsalazina (dimero di acido 5-aminosalicilico), balsalazide (5-ASA + 4-aminobenzol- β -alanina) e varie forme di mesalazina.

L'efficacia delle terapie risente della capacità, da parte del farmaco, di raggiungere in elevate concentrazioni i siti dove la patologia è in fase attiva, e in questo giustifica le diverse formulazioni che possono essere variamente impiegate in funzioni delle esigenze terapeutiche.

L'azione principale del salicilato è il blocco della sintesi di prostaglandine inibendo le ciclossigenasi. Altri potenziali meccanismi d'azione comprendono: la modulazione dei mediatori dell'infiammazione derivati dalla lipossigenasi, l'interferenza con la produzione di citochine proinfiammatorie e con l'attività di NF- κ B, e l'inibizione delle funzioni cellulari delle cellule natural killer, dei linfociti mucosali e dei macrofagi.

La sulfasalazina può causare possibili effetti indesiderati, soprattutto dose-dipendenti, i quali includono nausea, disturbi gastrointestinali, cefalea, artralgie, mialgie, soppressione midollare, malessere generale. Inoltre, sono possibili reazioni da ipersensibilità con febbre, dermatite esfoliativa, pancreatite, polmonite, anemia emolitica, pericardite, epatite. Gli altri preparati sono invece generalmente ben tollerati (*Antony 2011*).

1.2.1.2. GLUCOCORTICOIDI

I glucocorticoidi più comunemente impiegati nella pratica gastroenterologa sono prednisone e prednisolone. L'idrocortisone in clisma, schiuma o supposta è usato per massimizzare gli effetti a livello colico e minimizzare l'assorbimento sistemico. Budesonide è un potente analogo sintetico del prednisolone, dotato di bassa biodisponibilità per via orale, e risulta preferibile al prednisolone in caso di malattia ileale o ileo-ciecale.

I glucocorticoidi agiscono inibendo la produzione di chemochine e citochine proinfiammatorie (quali TNF- α e IL-1), riducendo l'espressione di molecole di adesione cellulare dell'infiammazione e inibendo la trascrizione dei geni di ciclossigenasi-2 e NF-kB (*Antony, Riya. «Basic and Clinical Pharmacology 12th Edition» 2011*).

Sono farmaci usati frequentemente per indurre la remissione nella malattia di Crohn e nella colite ulcerosa non responsiva alla prima linea terapeutica con aminosalicilati; nel trattamento della patologia infiammatoria intestinale coinvolgente retto o sigma si preferisce somministrare glucocorticoidi per via rettale, perché si ha un assorbimento sistemico più basso. Non sono utili per il mantenimento della remissione (*Torres 2020*).

Diversi studi hanno confrontato l'efficacia e la sicurezza dei GC tradizionali con altri trattamenti misurando i tassi di remissione e gli effetti collaterali avversi. Due studi randomizzati in doppio cieco indipendenti, controllati con placebo, hanno mostrato che il 47% dei pazienti affetti da MC attivi trattati con prednisone (1 mg/kg, compreso tra 40 e 60 mg/die) ha raggiunto la remissione clinica, definita come punteggio CDAI < 150, rispetto al 26% dei pazienti trattati con placebo dopo 4 mesi di trattamento. Né la sulfasalazina (0,5-1 gr/15 kg) né l'azatioprina (2-2,5 mg/kg al giorno) hanno raggiunto un'efficacia significativa. Successivamente, uno studio controllato con placebo ha dimostrato che alte dosi di metilprednisolone (12-48 mg/die), sulfasalazina (3 gr/die) o entrambi, nei pazienti affetti da celiachia attiva, erano significativamente efficaci rispetto al placebo. I pazienti trattati con metilprednisolone (da solo o in combinazione con sulfasalazina) hanno mostrato un miglioramento più rapido rispetto alla sola sulfasalazina (*Dubois-Camacho 2017*).

1.2.1.3. CORTICOSTEROIDI

I trattamenti con i corticosteroidi per la cura delle IBD furono utilizzati negli anni '50, e sono utilizzati ancora oggi per trattare la malattia da moderata a grave, risultando efficaci nell'indurre la remissione quando si verifica la 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 (Hayashi 2004). L'utilizzo di corticosteroidi è ancora largamente empirico e mancano solide evidenze sugli schemi terapeutici. I CS si legano a specifici recettori i quali una volta attivati possono entrare nel nucleo e interagire con specifici fattori di trascrizione pro-infiammatori (come il fattore nucleare- kappa B e la proteina attivatrice-1), che reclutano complessi attivatori per inibire la trascrizione di alcuni geni infiammatori. I recettori CSs attivati possono legarsi a specifici elementi di risposta nella regione del promotore dei geni antinfiammatori a livello nucleare, al fine di regolare l'espressione dei geni antinfiammatori stessi. Inoltre, l'effetto antinfiammatorio dei CS può essere mediato da diversi recettori di membrana (Di Paolo, Pagnini, e Graziani 2021).

1.2.1.4. FARMACI BIOLOGICI ANTI- TNF- α

I farmaci anti-tumor necrosis factor-alfa (TNF- α) hanno modificato il metodo di trattamento delle patologie infiammatorie intestinali refrattarie ai farmaci convenzionali (corticosteroidi, immunomodulatori, etc.). Essi prevengono il legame del TNF con i recettori specifici, impedendone l'attività biologica (Jordan 2020).

Nelle IBD si verificano alterazioni di meccanismi che regolano la risposta dei linfociti Th1; una delle citochine proinfiammatorie fondamentali per la risposta delle cellule Th1 è il TNF- α . Anticorpi monoclonali anti-TNF possono creare legami crociati con i recettori per il TNF presenti sulla membrana cellulare ed inibire l'attività dei linfociti T e dei macrofagi.

I farmaci anti-TNF sono generalmente impiegati come farmaci di seconda linea in seguito al fallimento terapeutico con corticosteroidi o immunosoppressori, ma possono essere considerati come trattamento di prima scelta nei pazienti con malattie complesse: nella malattia di Crohn gli agenti anti-TNF hanno mostrato particolare efficacia quando usati nelle fasi iniziali della

malattia, prima che insorgano complicanze, ed è stato evidenziato un maggior beneficio da una terapia di associazione con azatiopirina o 6-mercaptopurina (*J. F. Colombel 2010; J.-F. Colombel 2007*). Nella colite ulcerosa i farmaci anti-TNF si presentano come una valida alternativa all'azatiopirina per conseguire il mantenimento della remissione o per ridurre il carico di glucocorticoidi nei casi di steroidi- dipendenza.

Le molecole disponibili attualmente sono infliximab, somministrato per via endovenosa, e adalimumab e, certolizumab, somministrati sottocute.

Infliximab è un anticorpo monoclonale IgG chimerico, 75% umano e 25% murino, che si lega con elevata affinità al TNF- α umano. È stata confermata la sua efficacia attraverso studi clinici randomizzati che hanno evidenziato la sua capacità di indurre e mantenere la remissione della malattia di Chron. Rappresenta una valida opzione nel trattamento della colite ulcerosa allo stato medio-grave, resistente al trattamento orale con mesalazina o corticosteroidi. Va considerato che la terapia con Infliximab può causare gravi reazioni epatiche, per cui viene eseguito un monitoraggio periodico degli enzimi epatici; può inoltre causare scompensi cardiaci nei pazienti cardiopatici.

Adalimumab è un anticorpo IgG anti-TNF monoclonale completamente umano: forma complessi con il TNF- α solubile e previene la sua interazione con i recettori presenti sulla superficie cellulare, con riduzione della funzionalità dei macrofagi e dei linfociti T.

Certolizumab pegol è invece un anticorpo monoclonale anti-TNF peghilato che può essere usato nella malattia di Chron.

La terapia anti TNF porta a una guarigione della mucosa danneggiata, riduce il tempo di ospedalizzazione e gli interventi chirurgici, migliorando la qualità della vita del paziente. I dati sulla sicurezza indicano che si verificano infezioni gravi nel 2-4% dei pazienti trattati con la terapia anti-TNF, senza una differenza statisticamente significativa rispetto ai controlli. Il rischio di rari eventi quali la comparsa di tumori solidi o di linfomi nei pazienti affetti da IBD e trattati con la terapia anti-TNF richiederà una maggior durata dei follow-up clinici. Attualmente, il rapporto rischio-beneficio della terapia anti-TNF supporta il suo utilizzo in corso di IBD (*«Minerva Gastroenterologica e Dietologica 2010»*).

1.2.1.5. IMMUNOMODULATORI

Gli immunomodulatori sono importanti per i pazienti con IBD e includono tiopurina (TP) e metotrexato (MTX). È stato dimostrato che riducono la dipendenza da steroidi e mantengono la remissione, ma non è chiaro se riducano la necessità di un intervento chirurgico nella CD.

Nella progressione delle IBD, i linfociti T attivati si infiltrano nel sito infiammatorio della mucosa intestinale e producono una varietà di citochine, aggravando l'infiammazione intestinale. Le TP, tra cui azatiopirina (AZA) 6-mercaptopurina (MP) e 6-tioguanina (TG) potrebbero controllare l'infiammazione intestinale inibendo la proliferazione e l'attivazione dei linfociti T. Questi profarmaci 6-TP inattivi vengono metabolizzati in deossi-6-tioguanosina fosfato farmacologicamente attivo (deossi-6-TGNP), il quale può interferire con la sintesi del DNA e inibire la proliferazione dei linfociti. Inoltre, il 6-TGNP può legarsi a Rac1 per formare il complesso 6-TGNP-Rac1, bloccando l'attivazione di Rac1 nei linfociti T e inibendo la sopravvivenza e la funzione dei linfociti T stessi.

È stato dimostrato che l'AZA ha un effetto terapeutico favorevole e simile su CD e UC, aiutando a ridurre i tassi di ospedalizzazione e chirurgia dei pazienti con IBD.

Le TP hanno diversi effetti collaterali negativi, come la soppressione del midollo osseo, il danno epatico e l'intolleranza gastrointestinale a reazioni avverse, la maggior parte delle quali si verificano entro tre mesi di trattamento; il loro utilizzo è quindi diminuito a causa delle preoccupazioni in riferimento a queste reazioni (*Cai, Wang, e Li 2021*).

1.2.2. TRATTAMENTI ALTERNATIVI ALLE TERAPIE CONVENZIONALI

Una delle cause dello sviluppo delle IBD risulta essere una risposta immunitaria squilibrata ai microbi, insieme a una compromissione del microbiota intestinale. Probiotici, prebiotici e simbiotici vengono dunque utilizzati per andare a ripristinare l'equilibrio microbico intestinale, andando a migliorare la funzione di barriera e migliorando la risposta immunitaria locale.

Dati sperimentali e osservazioni cliniche suggeriscono un ruolo importante della complessa flora intestinale nello sviluppo dell'infiammazione della mucosa alla base delle IBD. Ad esempio, la deviazione del flusso fecale è associata a un miglioramento distale nei pazienti con CD e la recidiva si verifica costantemente al ripristino del flusso fecale. I pazienti con CU sottoposti a intervento di anastomosi della tasca ileale-aleale possono sviluppare un'infiammazione della mucosa dopo la ricolonizzazione batterica della tasca ileale da parte

del colon attraverso la stasi fecale. Alcuni microrganismi probiotici della normale microflora intestinale come *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*, hanno dimostrato di essere efficaci nel mantenimento della remissione della CU, suggerendo un potenziale effetto antinfiammatorio (Ott 2004).

1.2.2.1. I PROBIOTICI

I probiotici sono microrganismi vivi che avvantaggiano gli esseri umani promuovendo la salute dell'intestino e del sistema immunitario, previa ingestione degli stessi in quantità indicate accettabili. I probiotici hanno numerosi effetti benefici, possono ridurre i microrganismi dannosi e mantenere l'equilibrio microbico all'interno dell'intestino bloccando il sito di adesione, competendo per i nutrienti e uccidendo i microrganismi patogeni. I batteri probiotici producono acidi grassi a catena corta (SCFA) e butirrato, abbassando così i livelli di pH nel colon e limitando la crescita dei patogeni (Mijan e Lim 2018a; Picardo 2020).

Diversi studi hanno dimostrato che l'uso di specifici ceppi probiotici, se somministrati in adeguate quantità e per un tempo che ne garantisca la colonizzazione, possono avere un effetto positivo sull'ospite. Tra i ceppi più utilizzati troviamo lattobacilli e bifidobatteri; in particolare i bifidobatteri hanno dimostrato un'importante attività antinfiammatoria modulando NF-kB e le citochine pro-infiammatorie, linea di trattamento utile nelle IBD (Sanders 2019). Funzionano come agenti antinfiammatori e immunomodulatori: modulano la via di segnalazione NF-kB, down-regolano le citochine infiammatorie e l'espressione del recettore Toll-like, sopprimono il TNF- α e inducono l'espressione di citochine protettive come IL-10 (Mijan e Lim 2018; Picardo 2020).

Lactobacillus e *Bifidobacteria* sono i due generi più studiati e più efficaci nell'alleviare l'infiammazione gastrointestinale.

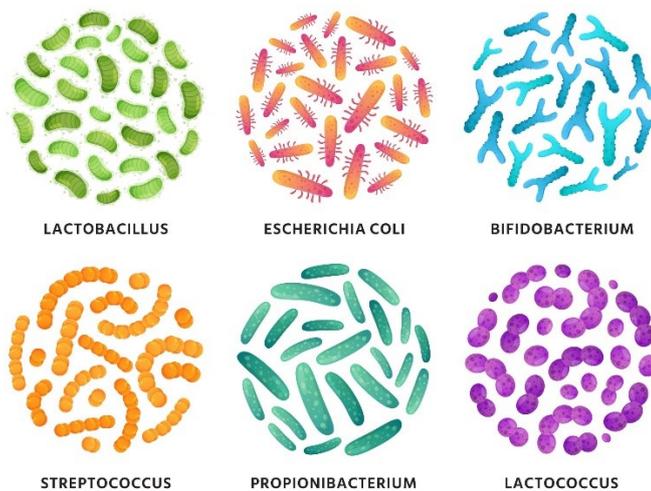


Figura 10. Batteri presenti nell'intestino umano

Il *Lactobacillus suntoryeus* va a sopprimere l'espressione del recettore (TLR) -4 legato a NF-kB e IL-6 nella colite indotta da TNBS (acido trinitrobenzensolfonico). Anche il *Bifidobacterium adolescentis* IM38 ha alleviato l'infiammazione sottoregolando l'espressione di NF-kB e la produzione di lipopolisaccaridi nella colite ulcerosa indotta da dieta ricca di grassi nei topi.

È stato inoltre esaminato l'utilizzo dei probiotici per il trattamento dell'UC da lieve a moderata in combinazione con la terapia con 5-ASA. La combinazione di balsalazide a basso dosaggio (2,25 g/die) e VSL#3 (contenente tre ceppi di *Bifidobacterium*, quattro ceppi di *Lactobacillus* e *Streptococcus thermophilus*) è risultata più efficace della sola balsalazide (4,5 g/die) o della sola mesalazina (2,4 g/die).

Non sono presenti ancora prove chiare a sostegno dei probiotici per l'inibizione o il mantenimento della remissione nella malattia di Crohn (Picardo 2020).

1.2.2.2. I PREBIOTICI

I prebiotici sono composti alimentari che causano cambiamenti specifici nella combinazione e/o nell'attività del microbiota gastrointestinale, mentre i probiotici sono organismi vivi che se somministrati in dosi adeguate conferiscono un beneficio per la salute dell'ospite.

Polisaccaridi non amidacei (NPS), classificati come fibre alimentari e prebiotici, vengono ottenuti da diverse fonti naturali che sono state studiate come terapie contro l'infiammazione e altre problematiche immunitarie. I componenti di NPS sono cellulosa, glucomannano, glucano, pectina, inulina e oligosaccaridi, e hanno dimostrato funzioni antinfiammatorie e immunomodulatorie. La maggior parte dei componenti NPS raggiunge intatta l'intestino crasso, dove viene fermentata da batteri probiotici.

I prebiotici possono modificare la composizione del microbiota intestinale, migliorare le funzioni della barriera intestinale e stimolare i microbi del tratto digestivo a produrre benefici per l'ospite. I dati sull'utilizzo dei prebiotici sono tuttavia limitati. Sembra che possano essere utili nei pazienti con bassa attività clinica della malattia, o per mantenere la remissione.

Negli studi clinici i prebiotici che vengono utilizzati sono classi di oligosaccaridi e inulina. Gli studi sugli esseri umani con IBD hanno dimostrato che l'uso di buccia di psillio ha alleviato i sintomi gastrointestinali nei pazienti con CU in remissione.

In Giappone sono stati condotti diversi studi clinici per trattare l'UC con cibo d'orzo germinato (GBF), prodotto composto principalmente da fibre alimentari e proteine ricche di glutammina. È stato dimostrato che GBF può ridurre l'attività clinica nei pazienti con CU da lieve a moderata e sembra essere una terapia efficace per il mantenimento della remissione in questi pazienti (*Akutko e Stawarski 2021*).

Il glucomannano di Konjac è un polisaccaride di origine vegetale usato per trattare i disturbi infiammatori gastrointestinali. In uno studio è stata valutata l'integrazione con konjac glucomannano idrolizzato per quattordici giorni a pazienti con IBD, e si è notato un miglioramento del movimento intestinale, costanza fecale, riduzione del dolore, oltre che un miglioramento nello stile di vita in generale (*Mijan e Lim 2018*).

Oltre ai composti citati vi sono diversi estratti di origine vegetale che possiedono forti effetti terapeutici contro le IBD: le attività antinfiammatorie di questi estratti derivano principalmente dalla loro capacità di modulare le citochine infiammatorie. Per questo motivo si assiste ad un crescente interesse nello sviluppo di una terapia IBD efficace basata su estratti vegetali (*Mijan e Lim 2018*).

Il resveratrolo è un importante polifenolo che si trova abbondantemente nelle arachidi, nei frutti di bosco e nell'uva rossa; esso modula i processi ossidativi e le vie infiammatorie. Uno studio controllato randomizzato ha rivelato che i pazienti con UC integrati con resveratrolo avevano un'inflammatione inferiore e livelli ridotti di TNF- α e NF-kB rispetto al gruppo placebo.

L'*Aloe vera* (L.) Burm.f. è una pianta tropicale contenente un'abbondanza di sostanze fitochimiche, tra cui mannani acetilati, polimannani, antrachinone C-glicosidi, antroni, antrachinoni (emodina) e lectine. È uno dei rimedi naturali più comuni utilizzati dai pazienti con IBD. È stato riportato che ha effetti antiulcera e immunomodulatori. Essa è stata studiata in un modello animale di colite ed è stato dimostrato che una



Figura 11. Aloe vera (L.)

preparazione di gel di aloe vera migliora il danno tissutale del colon nella colite indotta da DSS (destrano sodio solfato) nei ratti, abbassando i mediatori dell'inflammatione (TNF- α) e attenuando il reclutamento delle cellule immunitarie (*Triantafyllidi 2015; Picardo 2020*).

1.2.2.3. I SIMBIOTICI

Sono la combinazione sinergica di probiotici e prebiotici che si può trovare in alcuni alimenti, farmaci e integratori. Il termine simbiotico si riferisce al sinergismo, quindi deve essere riservato solo ai prodotti in cui il composto prebiotico favorisce selettivamente l'organismo probiotico. I simbiotici sono stati sviluppati per superare le potenziali difficoltà di sopravvivenza dei probiotici, soprattutto durante il passaggio nel tratto gastrointestinale superiore. L'utilizzo di un simbiotico serve a contribuire a un impianto più efficace di un probiotico nel colon e a promuovere la crescita di ceppi probiotici (*Akutko e Stawarski 2021*).

2. OBIETTIVI

Gli studi effettuati in questo progetto 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*, in condizioni normali e in presenza di stimoli infiammatori indotti. Il modello cellulare usato è basato sulla linea cellulare Caco-2, isolate da un adenocarcinoma coloretale umano e in grado, dopo differenziamento, di mimare sia per morfologia che per funzionalità, l'epitelio intestinale *in vivo*.

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 su modello cellulare Caco-2. Per motivi di segretezza il prodotto utilizzato verrà riportato con la sigla C. In particolare, è stata valutata la citotossicità di tale prodotto mediante uno screening a diverse concentrazioni dello stesso e l'impiego del Crystal Violet Assay.

Una volta selezionate le concentrazioni opportune, lo studio è proseguito andando a valutare il potenziale effetto protettivo di C sull'integrità e la funzione della barriera intestinale, in basale e sotto stress infiammatorio (TNF- α /IFN- γ e LPS), mediante la misurazione della resistenza elettrica transepiteliale (TEER).

3. MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

Negli anni '70 sono state stabilite diverse linee di cellule epiteliali da tumori gastrointestinali utili nella sperimentazione e ricerca preclinica: lo scopo principale, tuttora, consiste nello studio dei meccanismi alla base del cancro. A causa dell'eterogeneità delle cellule epiteliali intestinali primarie sia in termini di morfologia che di funzione, vale a dire enterociti dell'intestino tenue, cellule caliciformi, cellule enteroendocrine, cellule di Paneth e cellule M, si è reso necessario differenziare le cellule tumorali in tipi cellulari più specializzati. Molte delle linee cellulari sono solo parzialmente differenziate mediante l'aggiunta di fattori sintetici o biologici al terreno. Tra le diverse linee cellulari, le Caco-2 (derivate da adenocarcinoma coloretale umano) rappresentano l'unico modello in grado di differenziarsi spontaneamente una volta raggiunta la confluenza cellulare.

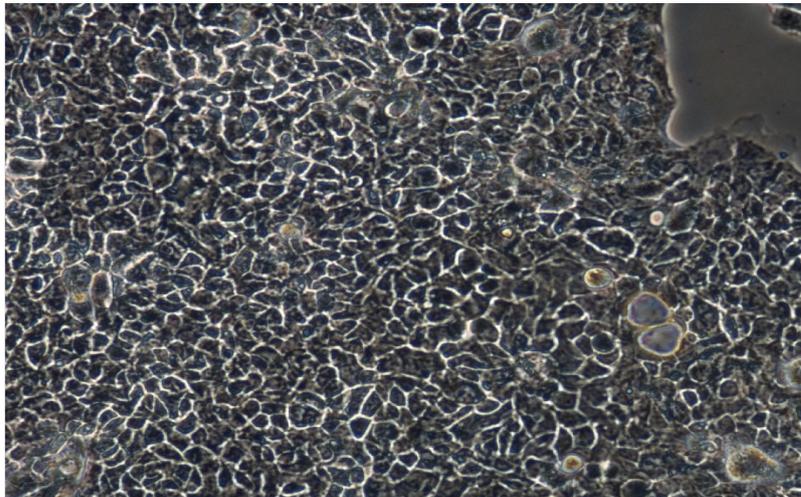


Figura 12. Cellule Caco-2 in coltura

I primi studi hanno rivelato che le cellule Caco-2 differenziate esprimono diverse proprietà morfologiche e funzionali caratteristiche degli enterociti dell'intestino tenue, e raggiunta la confluenza cellulare iniziano a polarizzarsi, acquisendo un bordo apicale che presenta microvilli (Lea 2015).

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 (*Sun 2008*). La linea cellulare Caco-2 cresce in adesione e viene mantenuta in coltura con medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, *Gibco*) addizionato con 10% di FBS (Fetal Bovine Serum, *Lonza*), 1% di L-glutammina e 1% di una mix antibiotica (Penicillina/Streptomicina, *Lonza*). Le colture cellulari sono seminate in *flask* da 25mL e mantenute a una temperatura di 37° C in incubatore, con atmosfera umidificata al 5% di CO₂. La morfologia cellulare e la confluenza vengono monitorate ogni giorno: all' 80% di confluenza, generalmente dopo 4-5 giorni, le cellule vengono lavate con PBS (Phosphate Buffered Saline, *Lonza*), staccate successivamente del fondo della *flask* con 1mL di tripsina e incubate nuovamente a 37°C per 5', al fine di permettere il distacco delle cellule dal fondo della *flask*. Una volta che le cellule si sono staccate, la tripsina viene disattivata con 2ml circa di terreno DMEM, si procede poi con la semina o il passaggio in una nuova *flask*.

3.1.1. PRODOTTO C

Nella sperimentazione è stato testato un probiotico multiceppo che per motivi di segretezza sperimentale sarà identificato come “prodotto C”. Questo prodotto è formato da una miscela di batteri vivi liofilizzati e i ceppi batterici presenti appartengono ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

3.1.2. PARADIGMI INFIAMMATORI: LPS e TNF- α / γ

LPS è un componente strutturale della membrana esterna dei batteri Gram- negativi. Può stimolare il rilascio di interleuchina 8 (IL-8) e altre citochine infiammatorie in vari tipi di cellule, portando a una risposta infiammatoria acuta (*Ngkelo 2012*). È stato dimostrato come LPS sia in grado di incrementare la permeabilità intestinale alterando l'architettura delle tight junctions.

L'IFN- γ è un immunoregolatore della risposta cellulo-mediata. Ha un'azione di attivazione della presentazione dell'antigene da parte dei macrofagi, aumenta l'attività lisosomiale dei macrofagi stessi, incrementa l'attività delle cellule NK, attiva APC e promuove la differenziazione dei linfociti T naïve in Th1.

TNF- α è una citochina coinvolta nell' infiammazione sistemica, fa parte delle citochine che stimolano la reazione della fase acuta. Viene prodotta principalmente dai macrofagi. È una delle prime citochine ad essere rilasciata in seguito ad infezioni batteriche e virali, soprattutto da Gram-negativi; è coinvolta nell'attivazione di cellule endoteliali, nei processi di infiammazione locale, nell'induzione di proteine della fase acuta e nel meccanismo di insorgenza della febbre.

3.2. SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE (CRYSTAL VIOLET ASSAY)

I saggi cellulari vengono utilizzati nella ricerca biomedica e negli screening per la scoperta di nuovi farmaci per quantificare in modo efficiente la citotossicità, l'attività biologica, i meccanismi biochimici e le interazioni off-target. Tali saggi hanno il vantaggio di facilitare la produzione di dati complessi e biologicamente rilevanti. Rispetto ai test biochimici tradizionali, i saggi basati su cellule sono più significativi dal punto di vista fisiologico e consentono di valutare le caratteristiche di più composti contemporaneamente.

Per effettuare il test di vitalità cellulare è stata utilizzata una colorazione con Crystal Violet Assay, un colorante trifenilmetano in grado di legare DNA e proteine delle cellule in adesione. L'utilizzo del Crystal Violet Assay come colorante cellulare è stato indicato per la prima volta negli anni 80 da Robert Koch per visualizzare i bacilli della tubercolosi. Il principio è il seguente: le cellule aderenti si staccano dalle piastre di coltura cellulare durante la morte cellulare, e questa caratteristica può essere utilizzata per la quantificazione indiretta della morte cellulare, per determinare le differenze nella proliferazione dopo trattamento con agenti che inducono citotossicità. Il colorante Crystal Violet Assay si va a legare al fondo del pozzetto in maniera proporzionale alla quantità di DNA presente sul fondo dello stesso, rendendo possibile la sua quantificazione.

Il test di vitalità Crystal Violet Assay è stato effettuato seminando le cellule 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°C (5% CO₂). Successivamente, il terreno dei pozzetti viene sostituito con le diverse concentrazioni del prodotto da testare e le piastre vengono nuovamente incubate per 48 ore. 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 50 μ L di Crystal Violet Assay e si lascia agire il colorante per 20 minuti. Terminato il tempo necessario al Crystal Violet Assay 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 200 μ L 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 uno spettrofotometro (MultilabelPlate Reader VICTOR TM X3 2030).

3.3. MISURAZIONE DELLA RESISTENZA ELETTRICA TRANSEPITELIALE – TEER

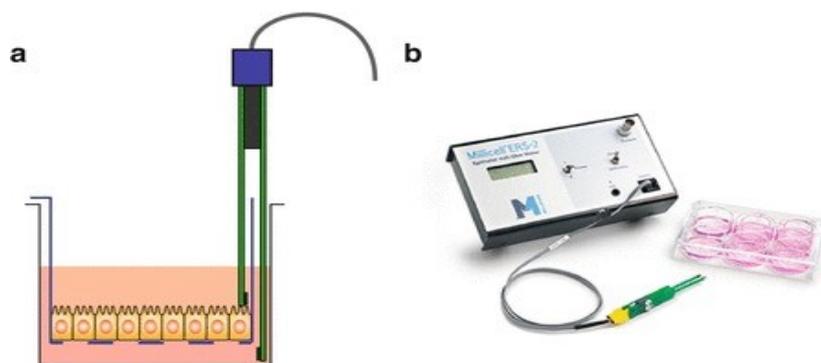


Figura13. La figura mostra l'unità Millicell ERS-2 con un elettrodo a bacchetta STX (13b). A sinistra (13a), una rappresentazione dell'elettrodo posizionato in un inserto di coltura tissutale. Si noti che la punta più corta dell'elettrodo non deve essere in contatto con lo strato cellulare, mentre la punta lunga deve toccare appena il fondo della camera esterna (Lea 2015)

Le misurazioni della resistenza elettrica transepiteliale (TEER) sono un approccio tecnico standard per valutare le proprietà e la dinamica della barriera di diversi modelli di coltura cellulare *in vitro*.

La TEER offre l'opportunità di monitorare l'omeostasi fisiologica e le condizioni patologiche *in vitro* in tempo reale e in modo non invasivo (Felix et al. 2021).

Le cellule Caco-2 vengono seminate su inserti transwell in una piastra da 24 pozzetti (Transwell BD Falcon TM): ogni pozzetto viene così suddiviso in due camere, una apicale e una basolaterale, separate da una membrana in poliestere con pori di 0.4 μ m, sulla quale viene fatto crescere il monostrato cellulare. Le cellule sono seminate ad una densità di 150000 cellule/pozzetto; i volumi di riempimento sono 500 μ l (di terreno DMEM) nella camera apicale e 750 μ l (dello stesso terreno di coltura) nella camera basolaterale. Le cellule vengono poi mantenute in incubatore a 37° C al 5% di CO₂, per favorire il raggiungimento della confluenza.

Ogni 3 giorni viene aspirato il terreno nella piastra, si lava poi con PBS e si pone nuovamente terreno fresco completo, sia nel lato apicale (500µl) che nel lato basolaterale (750µl). L'integrità delle cellule viene monitorata mediante la misura della resistenza elettrica trans-epiteliale del monolayer a confluenza dal 14° al 20° giorno dalla semina utilizzando un voltmetro.

Questo strumento è dotato di una coppia di elettrodi a bacchetta perfettamente inseribili nelle due camere originate dal transwell (un elettrodo viene inserito nella camera apicale mentre l'altro in quella basolaterale): si applica una differenza di potenziale di 3mV e si misura la resistenza che il monolayer cellulare oppone al passaggio di corrente. Lo strumento fornisce direttamente i valori della resistenza in ohm, e questi ultimi vanno rapportati all'area del pozzetto. Le misurazioni TEER vengono eseguite in HBSS (Hanks'Balanced Salt Solution, *Lonza*), questo perché il terreno cellulare come tale potrebbe influire sulle misurazioni.

Attraverso il saggio di vitalità cellulare sono state selezionate due concentrazioni di prodotto non citotossiche: 10×10^4 CFU/mL e 10×10^5 CFU/mL, utilizzate per il pretrattamento nell'esperimento di TEER: si pongono 500µl di prodotto in terreno DMEM nella camera apicale, e 750µl di solo terreno DMEM nella camera basolaterale. Passate le 24 ore si procede trattando le cellule con i differenti stimoli infiammatori: 750µl di LPS 250µg/mL, e l'associazione IFN- γ /TNF- α 10ng/mL in terreno DMEM, vengono applicati nella camera basolaterale, mentre nella camera apicale vengono nuovamente aggiunti 500µl il probiotico, previo washout.

Vengono quindi eseguite le misurazioni di TEER a tempi prestabiliti: 1 ora, 3 ore, 6 ore, 21 ore, 24 ore osservandone i cambiamenti. La TEER è stata espressa come percentuale di resistenza normalizzata al valore iniziale (t_0).

3.4. SAGGIO DI PERMEABILITA' PARACELLULARE

Le tight junctions regolano la diffusione passiva di sostanze mediante gli spazi paracellulari tra le cellule epiteliali, e questo processo può essere compromesso nel momento in cui il tessuto epiteliale risulta danneggiato (*Srinivasan et al. 2015*)

La permeabilità del monolayer di Caco-2 in transwell dopo il trattamento con stimoli infiammatori (LPS e INF- γ in associazione con TNF- α), è stata valutata tramite il passaggio

per via paracellulare della sonda isotiocianato di fluoresceina dal compartimento apicale a quello basolaterale.

Il saggio è stato svolto terminata l'ultima misurazione di TEER a 24 ore dal trattamento con gli stimoli infiammatori. Nella camera apicale di ciascun pozzetto, vengo aggiunti 15 μ l di isotiocianato di fluoresceina 0.01mM e la piastra è poi posta in incubatore a 37° C per 30 minuti. Trascorso il tempo necessario, si prelevano 200 μ l dalla camera basolaterale di ogni pozzetto e si trasferiscono in una piastra nera da 96 pozzetti per poter misurare la quantità di fluoresceina permeata. Si utilizza il Multilabel Plate Reader VICTOR™ X3 2030 (PerkinElmer, USA) (λ = 530nm).

4. RISULTATI

4.1. SAGGIO DI VITALITA' CELLULARE

I primi studi di questo progetto di tesi si sono concentrati sulla valutazione *in vitro* dell'effetto del prodotto C sulla vitalità della linea Caco-2 mediante l'impiego del test colorimetrico Crystal Violet.

Le cellule Caco-2 sono state trattate con concentrazioni di probiotico crescenti e la citotossicità è stata valutata dopo 48 ore di trattamento. Le varie concentrazioni testate sono state preparate da una soluzione madre di 10×10^9 CFU/mL in terreno DMEM, e successivamente sono state preparate delle diluizioni in serie in modo tale da ottenere le seguenti concentrazioni: 10×10^8 CFU/mL, 10×10^7 CFU/mL, 10×10^6 CFU/mL, 10×10^5 CFU/mL, 10×10^4 CFU/mL e 10×10^3 CFU/mL.

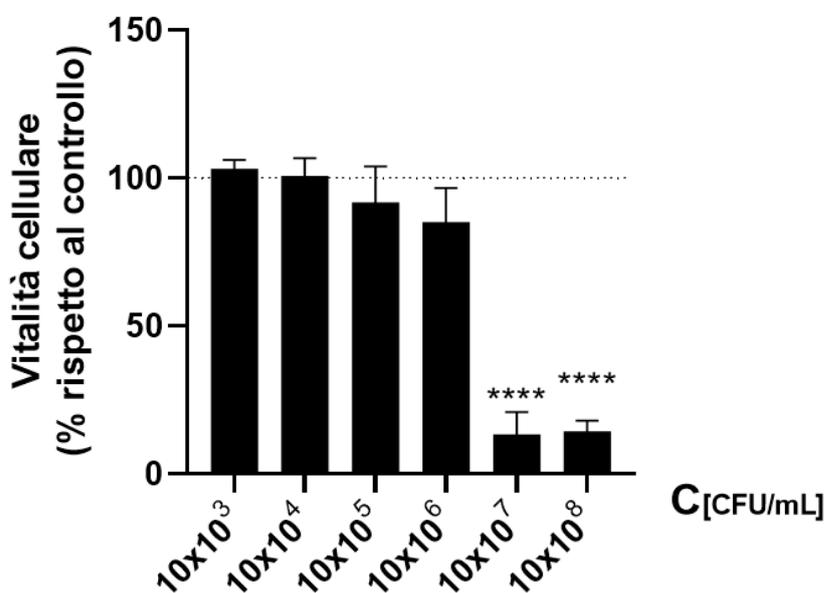


Figura 14. Effetto delle concentrazioni 10×10^3 , 10×10^4 , 10×10^5 , 10×10^6 , 10×10^7 , 10×10^8 CFU/mL del prodotto C sulla vitalità della linea cellulare Caco-2 dopo 48h di trattamento. I valori risultano espressi come media percentuale di Abs \pm SEM rispetto al controllo, ottenuti da 3 esperimenti indipendenti. **** $p < 0.0001$ trattato vs controllo.

Dalla Fig.14 è possibile notare come la vitalità cellulare non risulti significativamente alterata fino alla concentrazione massima di 10×10^6 CFU/mL. L'effetto citotossico del probiotico si manifesta alle concentrazioni più elevate, rispettivamente 10×10^7 e 10×10^8 CFU/mL. Tali concentrazioni riducono la vitalità cellulare rispetto al controllo in modo significativo a 48 ore

di trattamento. Alla luce di questi risultati, per gli esperimenti successivi sono state selezionate le concentrazioni di 10×10^4 e 10×10^5 CFU/mL, non citotossiche.

4.2. MISURAZIONE DELLA RESISTENZA ELETTRICA TRANSEPITELIALE – TEER

Nella Fig.15a viene rappresentato come, rispetto al controllo, il trattamento con LPS (250 μ g/ml) riduca significativamente la TEER già dopo 3 ore, e come la riduzione aumenti col passare del tempo. Anche l'associazione TNF α (10ng/mL) e IFN- γ (10ng/mL) comporta una tendenza alla diminuzione della TEER rispetto al controllo significativa a 21 ore. Una diminuzione dei valori di TEER è indice di un'aumentata permeabilità intestinale e quindi della presenza di un danno al monolayer cellulare.

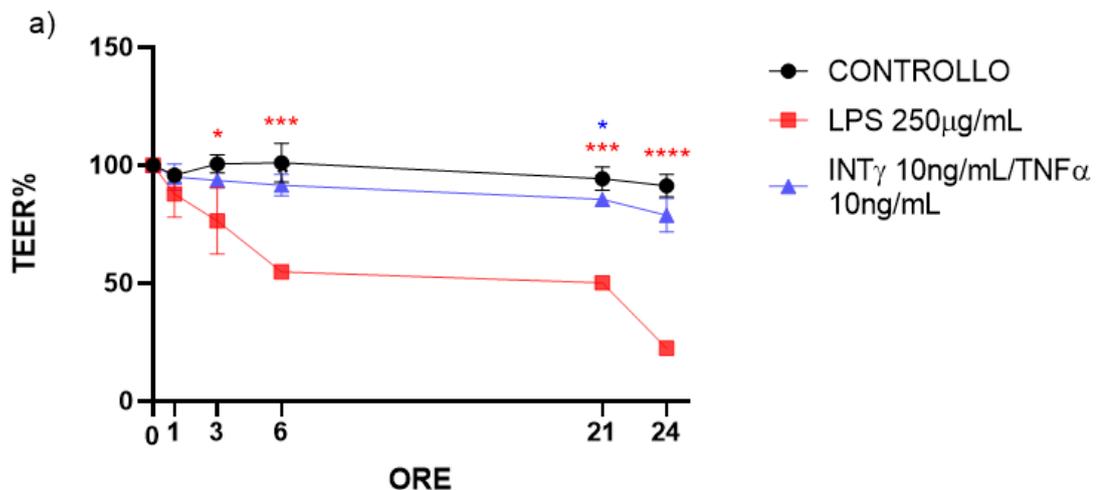


Figura 15a. Effetto di LPS (250 μ g/mL), e TNF α (10 ng/mL) e IFN- γ (10 ng/mL) sull'integrità della barriera dell'epitelio intestinale per 24 ore di trattamento. I dati sono espressi come % TEER rispetto al valore basale (t_0) \pm SEM, ottenuti da 3 esperimenti indipendenti. * p <0.05, *** p <0.001, **** p <0.0001 trattato vs controllo

Per quanto riguarda le misurazioni della TEER in presenza del prodotto, entrambe le concentrazioni testate (10×10^4 e 10×10^5 CFU/mL), rispetto al controllo, portano ad un aumento dei valori TEER, significativo ad ogni timepoint alla concentrazione di prodotto più elevata (Fig.15b).

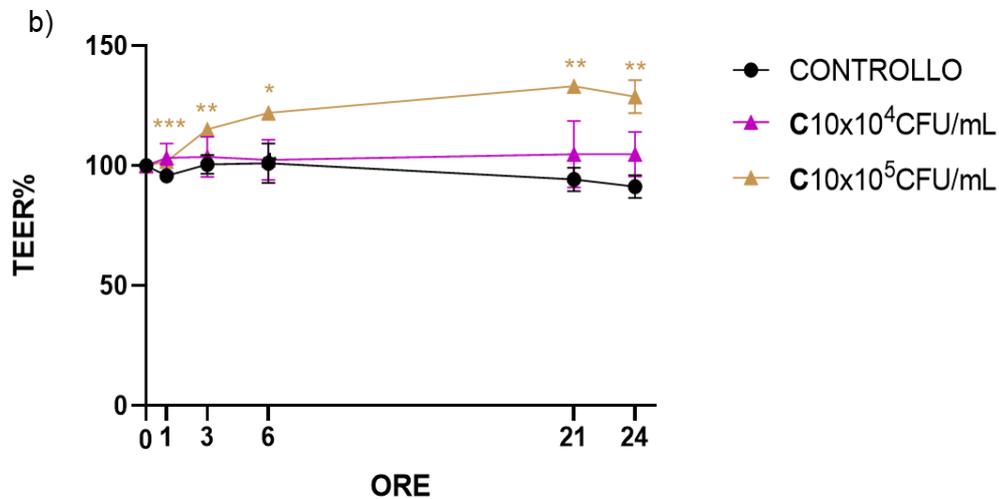


Figura 15b. Effetto del prodotto C 10×10^4 e 10×10^5 CFU/mL sull'integrità della barriera dell'epitelio intestinale per 24 ore di trattamento. I dati sono espressi come % TEER rispetto al valore basale (t_0) \pm SEM, ottenuti da 3 esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ trattato vs controllo.

In Fig.16 è possibile osservare gli effetti sulla TEER dati dalle associazioni tra il prodotto C e i differenti stimoli infiammatori. Le cellule Caco-2 pretrattate con il probiotico per 24h, e in seguito stimolate con gli agenti infiammatori, mostrano valori di TEER più alti se confrontati con il solo LPS o TNF α /IFN- γ . In particolare, il mix di probiotici alla concentrazione 10×10^4 CFU/mL permette un mantenimento della TEER rispetto al solo TNF- α /IFN- γ : l'aumento di TEER è significativo a 21 ore di trattamento, rispetto allo stimolo infiammatorio. Allo stesso modo, il prodotto C alla concentrazione di 10×10^4 CFU/mL in presenza di LPS porta all'aumento della TEER a tutte le tempistiche rispetto a quanto misurato nelle cellule trattate con solo LPS. Quest'aumento positivo può essere interpretato come potenziale effetto protettivo fornito dal probiotico multiceppo.

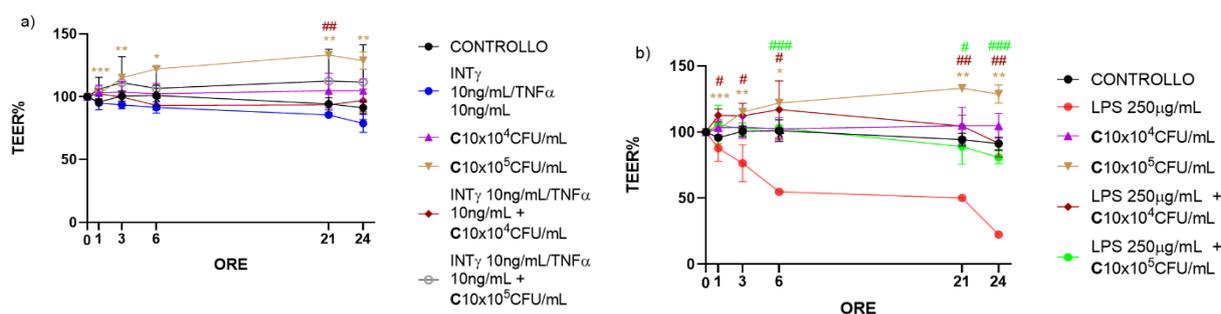


Figura 16.

a) Effetto di TNF_α (10 ng/mL) e IFN-_γ (10 ng/mL), prodotto C (10x10⁴ e 10x10⁵ CFU/mL) e relative associazioni sull'integrità della barriera dell'epitelio intestinale dopo 24 ore di trattamento.

b) Effetto di LPS (250 μg/mL), prodotto C (10x10⁴ e 10x10⁵ CFU/mL) e relative associazioni sull'integrità della barriera dell'epitelio intestinale dopo 24 ore di trattamento. I dati sono espressi come % TEER rispetto al valore basale (t₀) ± SEM, ottenuti da 3 esperimenti indipendenti. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 trattato vs controllo; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 trattato vs infiammazione.

4.3. PERMEABILITA' CELLULARE

L'alterazione dell'integrità dei monostrati di cellule Caco-2 viene valutata attraverso la misurazione del flusso paracellulare unidirezionale della sonda fluoresceina isotiocianato attraverso il monostrato.

Dopo aver effettuato tutte le misurazioni TEER, nella camera apicale di ogni pozzetto si aggiunge la fluoresceina e, trascorsi 30 minuti come indicato nel protocollo, viene effettuata la misurazione dell'intensità di fluorescenza della sonda permeata nella camera basale mediante spettrofotometro. L'intensità di fluorescenza della sonda è direttamente proporzionale al livello di permeabilità, e quindi di danno, del monostrato cellulare.

Nei grafici della Fig.17 è possibile osservare come tra i vari stimoli infiammatori, solo LPS 250μg/mL alteri in maniera significativa la permeabilità paracellulare rispetto al controllo, indice di maggiore capacità di indurre danno ai monostrati.

Il trattamento con il prodotto C, ad entrambe le concentrazioni di 10x10⁴ e 10x10⁵ CFU/mL, non altera la permeabilità dei monostrati cellulari (Fig.17a). Per quanto riguarda le associazioni tra probiotico e LPS (250μg/mL), e tra probiotico e TNF-_α/IFN-_γ (10ng/mL), esse mostrano

una tendenza alla riduzione di permeabilità rispetto alla sola infiammazione, anche se non significativa (Fig.17b-c)

a)

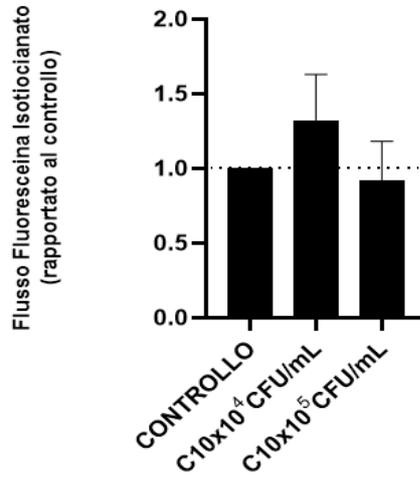
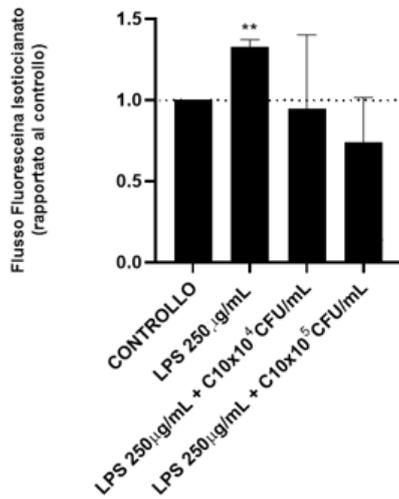


Figura 17a) Effetto del prodotto C (10×10^4 e 10×10^5 CFU/mL) sulla permeabilità paracellulare. I dati sono espressi come rapporto rispetto al controllo e sono la media \pm SEM di 3 esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$ trattato vs controllo.

b)



c)

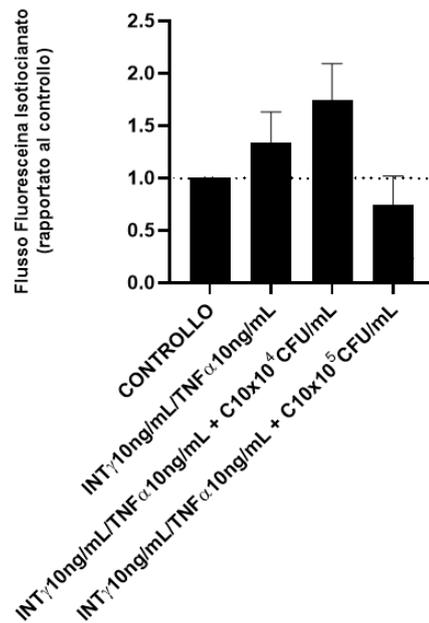


Figura 17b) Effetto di LPS (250 µg/mL) e delle associazioni con prodotto C c) Effetto di TNF- α (10 ng/mL) + IFN- γ (10ng/mL) e delle associazioni con prodotto C, sulla permeabilità paracellulare. I dati sono espressi come rapporto rispetto al controllo e sono la media \pm SEM di 3 esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$ trattato vs controllo.

5. DISCUSSIONE

La barriera della mucosa intestinale, nota come barriera intestinale, è una struttura selettivamente permeabile che garantisce l'assorbimento di acqua, elettroliti e nutrienti essenziali dal lume intestinale alla circolazione sistemica. Oltre a questo ruolo, la barriera intestinale media le interazioni tra il microbiota intestinale commensale e l'immunità dell'ospite, e costituisce una prima linea di difesa contro gli antigeni patogeni intraluminali e i microrganismi potenzialmente dannosi. La barriera intestinale è composta da vari elementi che aiutano nella sua funzione di confine di difesa fisica e immunologica (*Takiishi, Fenero, e Câmara 2017*).

La capacità di regolare i processi fisiologici che si verificano nell'intestino per mantenere gli stati interni stabili ed equilibrati, nota anche come omeostasi intestinale, dipende da complesse interazioni tra il microbiota, l'epitelio intestinale e il sistema immunitario dell'ospite. In particolare, le cellule epiteliali intestinali (IEC) fungono da sensori di prima linea per gli incontri microbici e la loro iporeattività è assicurata dal sistema immunitario innato dell'ospite che può discriminare tra segnali derivati da batteri commensali o patogeni.

Il mantenimento dell'omeostasi intestinale richiede anche l'integrità strutturale dell'epitelio intestinale, che è assicurata da complessi proteici giunzionali (cioè giunzioni strette, giunzioni aderenti e desmosomi) che regolano finemente la permeabilità intestinale e sigillano le cellule epiteliali adiacenti (*Stolfi et al. 2022*).

La disfunzione dell'integrità di barriera, dovuta a difetti nell'architettura delle tight junctions, (per ridotta espressione e traslocazione delle stesse), e/o all'alterazione delle funzioni delle cellule che compongono l'epitelio, possono portare ad un aumento della permeabilità intestinale con disbiosi e invasione da parte di agenti patogeni. Grazie a numerosi studi è stato reso sempre più evidente il legame tra disbiosi, disfunzione della barriera intestinale e alterata permeabilità intestinale come fattori eziologici dell'insorgenza di patologie, come le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) la celiachia, la sindrome dell'intestino irritabile, il cancro del colon-retto, il diabete (*Stolfi et al. 2022*).

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) sono caratterizzate da ripetuti episodi infiammatori del tratto gastrointestinale causati da una risposta non fisiologica della microflora intestinale. Le IBD comprendono diverse patologie, tra cui il morbo di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (CU), che si distinguono 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. Le malattie infiammatorie intestinali possono verificarsi in individui geneticamente suscettibili dopo una risposta immunitaria inappropriata della flora intestinale nei confronti di vari tipi di stimoli. L'eziologia di queste patologie è ancora oggi sconosciuta in quanto sono state riscontrate molte cause di IBD, ma nessuna è universalmente presente in tutti i pazienti. Le IBD si manifestano in prevalenza nei pazienti giovani e sono malattie croniche, ovvero persistono per tutta la vita del paziente provocando un peggioramento della qualità di vita. Inoltre, le IBD comportano un carico psicologico non indifferente; infatti, molti pazienti sviluppano depressione e ansia. I trattamenti tradizionali utilizzati mirano alla remissione delle IBD e generalmente sono impiegati aminosalicilati, corticosteroidi o immunomodulatori come anticorpi monoclonali anti-TNF- α . Non essendo molto chiare le cause di insorgenza delle IBD, questi trattamenti risultano aspecifici e in alcuni casi inefficaci; inoltre, l'impiego di questi farmaci tradizionali provoca lo sviluppo di gravi e numerosi effetti collaterali. Per questi motivi si avverte sempre più l'esigenza dello sviluppo di terapie alternative basate su sostanze naturali potenzialmente efficaci e sicure.

Negli ultimi anni, sono emerse numerose evidenze riguardanti l'importanza dei probiotici. Essi, possono essere considerati dei "potenziatori di barriera", influenzando positivamente la composizione del microbiota e lo stato metabolico delle cellule epiteliali intestinali. L'OMS definisce i probiotici come "microrganismi vivi che se somministrati in quantità adeguata, apportano benefici alla salute dell'ospite" e sono ritenuti una buona strategia per prevenire e/o trattare la disfunzione della barriera intestinale.

L'obiettivo della tesi è stato quello di 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 C a diverse concentrazioni d'impiego (10^4 e 10^5 CFU/mL) sui danni indotti alla funzione di barriera intestinale per mezzo di stimoli infiammatori quali LPS 250 μ g/mL e TNF- α /IFN- γ , entrambi 10ng/mL. Inizialmente è stata valutata la citotossicità del prodotto C sui monostrati cellulari, per individuare concentrazioni utili al proseguimento delle analisi: i risultati ottenuti hanno permesso di escludere le concentrazioni che provocano una riduzione della vitalità cellulare e di mantenere solo quelle che non causano effetti citotossici significativi.

Successivamente, i monostrati di cellule Caco-2 sono stati trattati con LPS e con un'associazione IFN- γ /TNF- α , separatamente, per indurre infiammazione e valutarne gli effetti.

L'integrità e la funzione di barriera dei monostrati cellulari sono state valutate attraverso misurazioni della resistenza elettrica transepiteliale a tempi prestabiliti. La TEER è considerata una delle tecniche specifiche e sensibili per valutare alterazioni della barriera epiteliale (Catanzaro et al. 2015).

Tra i due stimoli infiammatori usati, LPS ha dimostrato una maggior capacità di indurre un danno infiammatorio rispetto a IFN- γ /TNF- α , come confermato dai valori di TEER più bassi già dopo 3 ore di incubazione. Questi risultati confermano ciò che è stato riportato in diversi studi, vale a dire l'alterazione dell'integrità del monostrato cellulare e quindi anche della sua funzione di barriera indotta da LPS.

Dopo aver confermato il danno indotto da LPS e da IFN- γ /TNF- α , si è testato l'effetto protettivo esercitato dal mix di probiotici. I monostrati Caco-2 sono stati pretrattati con il prodotto C per 24 ore e successivamente trattati con gli stimoli infiammatori LPS e IFN- γ /TNF- α . I risultati ottenuti dimostrano come la formulazione C, contenente una combinazione di *Lactobacilli* e *Bifidobacteria*, ha preservato l'integrità del monostrato dal danno causato dagli stimoli infiammatori, in particolare da LPS: le misurazioni TEER, infatti, si sono rivelate più alte rispetto allo stimolo infiammatorio. Inoltre, dai saggi di permeabilità paracellulare non si evincono differenze significative delle associazioni tra stimolo infiammatorio e prodotto C rispetto al controllo; si ha anzi una tendenza ad una riduzione della permeabilità paracellulare data dal prodotto C alla concentrazione più elevata rispetto alla sola infiammazione, indice di una protezione all'integrità del monostrato cellulare fornita dal prodotto.

La rigenerazione della barriera mucosale danneggiata a seguito di una perturbazione infiammatoria, nonché il ripristino dell'omeostasi intestinale, è sempre stato considerato un approccio terapeutico promettente per il trattamento di molteplici malattie in cui la permeabilità intestinale risulta alterata come nelle IBD. La formulazione probiotica multiceppo testata in questo progetto di tesi ha dimostrato di poter ridurre il danno infiammatorio fornendo punti di riflessione sui meccanismi con cui i probiotici sono in grado di prevenire l'alterazione della barriera epiteliale intestinale.

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.

6. BIBLIOGRAFIA

- Akutko, Katarzyna, e Andrzej Stawarski. 2021. «Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in Inflammatory Bowel Diseases». *Journal of Clinical Medicine* 10 (11): 2466. <https://doi.org/10.3390/jcm10112466>.
- Antony, Riya. s.d. «-Basic and Clinical Pharmacology 12th Edition=Bertram Katzung Susan Masters Anthony Trevor=». https://www.academia.edu/44692644/_Basic_and_Clinical_Pharmacology_12th_Edition_Bertram_Katzung_Susan_Masters_Anthony_Trevor_.
- Bamias, Giorgos, Mark R. Nyce, Sarah A. De La Rue, Fabio Cominelli, American College of Physicians, e American Physiological Society. 2005. «New Concepts in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease». *Annals of Internal Medicine* 143 (12): 895–904. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-143-12-200512200-00007>.
- Baumgart, Daniel C., e William J. Sandborn. 2012. «Crohn's Disease». *Lancet (London, England)* 380 (9853): 1590–1605. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9).
- Bernstein, C. N., J. F. Blanchard, D. S. Houston, e A. Wajda. 2001. «The Incidence of Deep Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism among Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study». *Thrombosis and Haemostasis* 85 (3): 430–34.
- Brentnall, T. A., R. C. Haggitt, P. S. Rabinovitch, M. B. Kimmey, M. P. Bronner, D. S. Levine, K. V. Kowdley, et al. 1996. «Risk and Natural History of Colonic Neoplasia in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis and Ulcerative Colitis». *Gastroenterology* 110 (2): 331–38. <https://doi.org/10.1053/gast.1996.v110.pm8566577>.
- Cai, Zhaobei, Shu Wang, e Jiannan Li. 2021. «Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review». *Frontiers in Medicine* 8 (dicembre): 765474. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.765474>.
- Calin, A., J. Porta, J. F. Fries, e D. J. Schurman. 1977. «Clinical History as a Screening Test for Ankylosing Spondylitis». *JAMA* 237 (24): 2613–14.
- Catanzaro, Daniela, Serena Rancan, Genny Orso, Stefano Dall'Acqua, Paola Brun, Maria Cecilia Giron, Maria Carrara, et al. 2015. «Boswellia serrata Preserves Intestinal Epithelial Barrier from Oxidative and Inflammatory Damage». *PLoS ONE* 10 (5): e0125375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125375>.
- Chiba, Hideki, Makoto Osanai, Masaki Murata, Takashi Kojima, e Norimasa Sawada. 2008. «Transmembrane Proteins of Tight Junctions». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Apical Junctional Complexes Part I*, 1778 (3): 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.017>.
- «Collins, Nguyen, and Badireddy, 'Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine'. - Cerca con Google». s.d. Consultato 6 dicembre 2022. <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=+Collins%2C+Nguyen%2C+and+Badireddy%2C+%E2%80%98Anatomy%2C+Abdomen+and+Pelvis%2C+Small+Intestine%E2%80%99>.
- Colombel, Jean Frédéric, William J. Sandborn, Walter Reinisch, Gerassimos J. Mantzaris, Asher Kornbluth, Daniel Rachmilewitz, Simon Lichtiger, et al. 2010. «Infliximab, Azathioprine, or Combination Therapy for Crohn's Disease». *The New England Journal of Medicine* 362 (15): 1383–95. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904492>.
- Colombel, Jean-Frédéric, William J. Sandborn, Paul Rutgeerts, Robert Enns, Stephen B. Hanauer, Remo Panaccione, Stefan Schreiber, et al. 2007. «Adalimumab for Maintenance of Clinical Response and Remission in Patients with Crohn's Disease:

- The CHARM Trial*». *Gastroenterology* 132 (1): 52–65.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.041>.
- Danese, Silvio, Miquel Sans, e Claudio Fiocchi. 2004. «Inflammatory Bowel Disease: The Role of Environmental Factors». *Autoimmunity Reviews* 3 (5): 394–400.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2004.03.002>.
- Di Paolo, Maria Carla, Cristiano Pagnini, e Maria Giovanna Graziani. 2021. «Corticosteroids in Inflammatory Bowel Disease Patients: A Practical Guide for Physicians». *Current Reviews in Clinical and Experimental Pharmacology* 16 (3): 210–18. <https://doi.org/10.2174/1574884715666200714114044>.
- Dubois-Camacho, Karen, Payton A Ottum, Daniel Franco-Muñoz, Marjorie De la Fuente, Alejandro Torres-Riquelme, David Díaz-Jiménez, Mauricio Olivares-Morales, Gonzalo Astudillo, Rodrigo Quera, e Marcela A Hermoso. 2017. «Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel diseases: From clinical practice to molecular biology». *World Journal of Gastroenterology* 23 (36): 6628–38.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i36.6628>.
- Felix, Kannapin, Schmitz Tobias, Hansmann Jan, Schlegel Nicolas, e Meir Michael. 2021. «Measurements of transepithelial electrical resistance (TEER) are affected by junctional length in immature epithelial monolayers». *Histochemistry and Cell Biology* 156 (6): 609–16. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02026-4>.
- Gasparetto, Marco, e Graziella Guariso. 2013. «Highlights in IBD Epidemiology and Its Natural History in the Paediatric Age». *Gastroenterology Research and Practice* 2013: 829040. <https://doi.org/10.1155/2013/829040>.
- Goh, Ian Y, Stefan Saric, Paul Leschke, Mark McFarlane, e Pankaj K Jha. 2017. «Thromboembolism in active ulcerative colitis». *BMJ Case Reports* 2017 (giugno): bcr2016218608. <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-218608>.
- Gooding, Jane M., Kyoko L. Yap, e Mitsuhiro Ikura. 2004. «The Cadherin-Catenin Complex as a Focal Point of Cell Adhesion and Signalling: New Insights from Three-Dimensional Structures». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 26 (5): 497–511. <https://doi.org/10.1002/bies.20033>.
- Hartsock, Andrea, e W. James Nelson. 2008. «Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1778 (3): 660–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>.
- Hayashi, Ryuji, Hiroo Wada, Kazuhiro Ito, e Ian M. Adcock. 2004. «Effects of Glucocorticoids on Gene Transcription». *European Journal of Pharmacology* 500 (1–3): 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.011>.
- Hermiston, M L, e J I Gordon. 1995. «In Vivo Analysis of Cadherin Function in the Mouse Intestinal Epithelium: Essential Roles in Adhesion, Maintenance of Differentiation, and Regulation of Programmed Cell Death.» *Journal of Cell Biology* 129 (2): 489–506. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.2.489>.
- Ho, Shuk-Mei, James D Lewis, Emeran A Mayer, Charles N Bernstein, Scott E Plevy, Emil Chuang, Stephen M Rappaport, et al. 2019. «Challenges in IBD Research: Environmental Triggers». *Inflammatory Bowel Diseases* 25 (Suppl 2): S13–23. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz076>.
- jordan. s.d. «Inibitori del Fattore di Necrosi Tumorale (TNF) e Anticorpi anti-inibi». *Labtests Online*. Consultato 15 maggio 2023. <https://labtestsonline.it/tests/inibitori-del-fattore-di-necrosi-tumorale-tnf-e-anticorpi-anti-inibitori-del-tnf>.
- Kaser, Arthur, Sebastian Zeissig, e Richard S. Blumberg. 2010. «Inflammatory Bowel Disease». *Annual Review of Immunology* 28: 573–621.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>.

- Kobayashi, Taku, Britta Siegmund, Catherine Berre, Shu-Chen Wei, Marc Ferrante, Bo Shen, Charles Bernstein, Silvio Danese, Laurent Peyrin-Biroulet, e Toshifumi Hibi. 2020. «Ulcerative colitis». *Nature reviews. Disease primers* 6 (settembre): 74. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0205-x>.
- Kong, Shanshan, Yanhui H. Zhang, e Weiqiang Zhang. 2018. «Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids». *BioMed Research International* 2018 (maggio): 2819154. <https://doi.org/10.1155/2018/2819154>.
- Krause, Gerd, Lars Winkler, Sebastian L. Mueller, Reiner F. Haseloff, Jörg Piontek, e Ingolf E. Blasig. 2008. «Structure and Function of Claudins». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1778 (3): 631–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.10.018>.
- Krug, S. M., C. Bojarski, A. Fromm, I. M. Lee, P. Dames, J. F. Richter, J. R. Turner, M. Fromm, e J.-D. Schulzke. 2018. «Tricellulin Is Regulated via Interleukin-13-Receptor A2, Affects Macromolecule Uptake, and Is Decreased in Ulcerative Colitis». *Mucosal Immunology* 11 (2): 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, e Michael Fromm. 2009. «Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability». *Molecular Biology of the Cell* 20 (16): 3713–24. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-01-0080>.
- Kuenzig, M. Ellen, Stephen G. Fung, Luba Marderfeld, Joyce W. Y. Mak, Gilaad G. Kaplan, Siew C. Ng, David C. Wilson, et al. 2022. «Twenty-First Century Trends in the Global Epidemiology of Pediatric-Onset Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review». *Gastroenterology* 162 (4): 1147-1159.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.12.282>.
- Lamb, Christopher Andrew, Nicholas A. Kennedy, Tim Raine, Philip Anthony Hendy, Philip J. Smith, Jimmy K. Limdi, Bu'Hussain Hayee, et al. 2019. «British Society of Gastroenterology Consensus Guidelines on the Management of Inflammatory Bowel Disease in Adults». *Gut* 68 (Suppl 3): s1–106. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318484>.
- Lea, Tor. 2015a. «Caco-2 Cell Line». In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, a cura di Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, e Harry Wichers. Cham (CH): Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500149/>.
- . 2015b. «Fig. 9.3, [The Figure Shows The Millicell...].» *Text*. Springer. 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500142/figure/ch9.Fig3/>.
- Levine, Jonathan S., e Robert Burakoff. 2011. «Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease». *Gastroenterology & Hepatology* 7 (4): 235–41.
- Mattos, Bruno Rafael Ramos de, Maellin Pereira Gracindo Garcia, Julia Bier Nogueira, Lisiery Negrini Paiatto, Cassia Galdino Albuquerque, Caique Lopes Souza, Luís Gustavo Romani Fernandes, Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, e Patricia Ucelli Simioni. 2015. «Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments». *Mediators of Inflammation* 2015 (agosto): e493012. <https://doi.org/10.1155/2015/493012>.
- McDowell, Christopher, Umer Farooq, e Muhammad Haseeb. 2022. «Inflammatory Bowel Disease». In *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470312/>.
- Mijan, Mohammad Al, e Beong Ou Lim. 2018a. «Diets, functional foods, and nutraceuticals as alternative therapies for inflammatory bowel disease: Present status and future

- trends». *World Journal of Gastroenterology* 24 (25): 2673–85.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i25.2673>.
- . 2018b. «Diets, functional foods, and nutraceuticals as alternative therapies for inflammatory bowel disease: Present status and future trends». *World Journal of Gastroenterology* 24 (25): 2673–85. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i25.2673>.
- «Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins - PubMed».
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10915631/>.
- Monsén, U., J. Sorstad, G. Hellers, e C. Johansson. 1990. «Extracolonic Diagnoses in Ulcerative Colitis: An Epidemiological Study». *The American Journal of Gastroenterology* 85 (6): 711–16.
- Monteleone, Giovanni, Daniele Fina, Roberta Caruso, e Francesco Pallone. 2006. «New Mediators of Immunity and Inflammation in Inflammatory Bowel Disease». *Current Opinion in Gastroenterology* 22 (4): 361–64.
<https://doi.org/10.1097/01.mog.0000231808.10773.8e>.
- «Mucosa intestinale - villi intestinali». <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/mucosa-intestinale.html>.
- Ng, Siew C., Hai Yun Shi, Nima Hamidi, Fox E. Underwood, Whitney Tang, Eric I. Benchimol, Remo Panaccione, et al. 2017. «Worldwide Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the 21st Century: A Systematic Review of Population-Based Studies». *Lancet (London, England)* 390 (10114): 2769–78.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0).
- Ngkelo, Anta, Koremu Meja, Mike Yeadon, Ian Adcock, e Paul A Kirkham. 2012. «LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and Gα dependent PI-3kinase signalling». *Journal of Inflammation (London, England)* 9 (gennaio): 1. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-1>.
- Oliveira, Stephanie B., e Iona M. Monteiro. 2017. «Diagnosis and Management of Inflammatory Bowel Disease in Children». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 357 (maggio): j2083. <https://doi.org/10.1136/bmj.j2083>.
- Orchard, T. R., B. P. Wordsworth, e D. P. Jewell. 1998. «Peripheral Arthropathies in Inflammatory Bowel Disease: Their Articular Distribution and Natural History». *Gut* 42 (3): 387–91. <https://doi.org/10.1136/gut.42.3.387>.
- Orchard, Timothy R., C. N. Chua, Tariq Ahmad, Hung Cheng, Kenneth I. Welsh, e Derek P. Jewell. 2002. «Uveitis and Erythema Nodosum in Inflammatory Bowel Disease: Clinical Features and the Role of HLA Genes». *Gastroenterology* 123 (3): 714–18.
<https://doi.org/10.1053/gast.2002.35396>.
- Ott, S J, M Musfeldt, D F Wenderoth, J Hampe, O Brant, U R Fölsch, K N Timmis, e S Schreiber. 2004. «Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease». *Gut* 53 (5): 685–93.
<https://doi.org/10.1136/gut.2003.025403>.
- Picardo, Sherman, Mansour Altuwaijri, Shane M. Devlin, e Cynthia H. Seow. 2020a. «Complementary and alternative medications in the management of inflammatory bowel disease». *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 13 (maggio): 1756284820927550. <https://doi.org/10.1177/1756284820927550>.
- . 2020b. «Complementary and alternative medications in the management of inflammatory bowel disease». *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 13 (maggio): 1756284820927550. <https://doi.org/10.1177/1756284820927550>.
- Pucciarelli, Salvatore. s.d. «Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali_6.10.2022».

- Saich, Rebecca, e Roger Chapman. 2008. «Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and overlap syndromes in inflammatory bowel disease». *World Journal of Gastroenterology* : WJG 14 (3): 331–37. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.331>.
- Sales-Campos, H., P.J. Basso, V.B.F. Alves, M.T.C. Fonseca, G. Bonfá, V. Nardini, e C.R.B. Cardoso. 2014. «Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 48 (2): 96–107. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143774>.
- Sanders, Mary Ellen, Daniel J. Merenstein, Gregor Reid, Glenn R. Gibson, e Robert A. Rastall. 2019. «Probiotics and Prebiotics in Intestinal Health and Disease: From Biology to the Clinic». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16 (10): 605–16. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>.
- Sartor, R. Balfour. 2006. «Mechanisms of Disease: Pathogenesis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis». *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology* 3 (7): 390–407. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0528>.
- Schneeberger, Eveline E., e Robert D. Lynch. 2004. «The Tight Junction: A Multifunctional Complex». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 286 (6): C1213-1228. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00558.2003>.
- Schultz, Ida, e Ása V. Keita. 2020. «The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability». *Cells* 9 (8): 1909. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>.
- Sheth, Tejas, Capecomorin S. Pitchumoni, e Kiron M. Das. 2014. «Musculoskeletal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease: A Revisit in Search of Immunopathophysiological Mechanisms». *Journal of Clinical Gastroenterology* 48 (4): 308–17. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000067>.
- Srinivasan, Balaji, Aditya Reddy Kolli, Mandy Brigitte Esch, Hasan Erbil Abaci, Michael L. Shuler, e James J. Hickman. 2015. «TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems». *Journal of laboratory automation* 20 (2): 107–26. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>.
- Stolfi, Carmine, Claudia Maresca, Giovanni Monteleone, e Federica Laudisi. 2022. «Implication of Intestinal Barrier Dysfunction in Gut Dysbiosis and Diseases». *Biomedicines* 10 (2): 289. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020289>.
- «Structural organization of the tight junctions - PubMed». s.d. Consultato 13 dicembre 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17945185/>.
- Sun, Huadong, Edwin Cy Chow, Shanjun Liu, Yimin Du, e K. Sandy Pang. 2008. «The Caco-2 Cell Monolayer: Usefulness and Limitations». *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4 (4): 395–411. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.395>.
- Suzuki, Takuya. 2013. «Regulation of Intestinal Epithelial Permeability by Tight Junctions». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 70 (4): 631–59. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>.
- Sýkora, Josef, Renáta Pomahačová, Marcela Kreslová, Dominika Cvalínová, Přemysl Štych, e Jan Schwarz. 2018. «Current global trends in the incidence of pediatric-onset inflammatory bowel disease». *World Journal of Gastroenterology* 24 (25): 2741–63. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i25.2741>.
- Takiishi, Tatiana, Camila Ideli Morales Fenero, e Niels Olsen Saraiva Câmara. 2017. «Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life». *Tissue Barriers* 5 (4): e1373208. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>.
- «The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton - PubMed». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9792688/>.

- Torres, Joana, Stefanos Bonovas, Glen Doherty, Torsten Kucharzik, Javier P Gisbert, Tim Raine, Michel Adamina, et al. 2020. «ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment». *Journal of Crohn's and Colitis* 14 (1): 4–22. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz180>.
- «Transmembrane proteins of tight junctions - PubMed». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17916321/>.
- «Trattamento con farmaci anti-TNF per la cura delle patologie infiammatorie intestinali: un'ampia review - Minerva Gastroenterologica e Dietologica 2010 June;56(2):233-43». <https://www.minervamedica.it/it/riviste/gastroenterology/articolo.php?cod=R08Y2010N02A0233>.
- Triantafyllidi, Aikaterini, Theodoros Xanthos, Apostolos Papalois, e John K. Triantafyllidis. 2015. «Herbal and Plant Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Disease». *Annals of Gastroenterology* 28 (2): 210–20.
- Turner, Jerrold R. 2009. «Intestinal Mucosal Barrier Function in Health and Disease». *Nature Reviews Immunology* 9 (11): 799–809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>.
- Uhlig, Holm H. 2013. «Monogenic Diseases Associated with Intestinal Inflammation: Implications for the Understanding of Inflammatory Bowel Disease». *Gut* 62 (12): 1795–1805. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303956>.
- Vermette, David, Pamela Hu, Michael F Canarie, Melissa Funaro, Janis Glover, e Richard W Pierce. 2018. «Tight junction structure, function, and assessment in the critically ill: a systematic review». *Intensive Care Medicine Experimental* 6 (settembre): 37. <https://doi.org/10.1186/s40635-018-0203-4>.
- Williams, Horace, David Walker, e Timothy R. Orchard. 2008. «Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease». *Current Gastroenterology Reports* 10 (6): 597–605. <https://doi.org/10.1007/s11894-008-0108-6>.
- Windsor, Joseph W., e Gilaad G. Kaplan. 2019. «Evolving Epidemiology of IBD». *Current Gastroenterology Reports* 21 (8): 40. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0705-6>.
- Yeshi, Karma, Roland Ruscher, Luke Hunter, Norelle L. Daly, Alex Loukas, e Phurpa Wangchuk. 2020. «Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products». *Journal of Clinical Medicine* 9 (5): 1273. <https://doi.org/10.3390/jcm9051273>.