



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

Dipartimento di Scienze Ambientali

Dottorato di Ricerca in Genetica e Biologia Cellulare (XVIII ciclo)

TESI DI DOTTORATO

**Studio dell'effetto dei probiotici sulla modulazione della risposta
immunitaria intestinale.**

s.s.d. BIO 10

Candidata

Dott.^{ssa} Maria Serena Britti

Coordinatore

Prof. Luigi Bosco

Tutori

Dott. Nicolò Merendino

Dott.^{ssa} Elena Mengheri

Anni Accademici

2002-2003

2003-2004

2004-2005

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1. Risposta immunitaria	7
1.2. Intestino	12
1.2.1. Immunità intestinale	14
1.2.2. Tolleranza orale	18
1.2.2.1. Meccanismi coinvolti nell'induzione della tolleranza orale	20
1.3 Probiotici	24
1.3.1 Capacità di colonizzazione del tratto intestinale	27
1.3.2 Capacità di adesione alla mucosa intestinale	28
1.3.3 Prevenzione della diarrea e degli stati infiammatori intestinali	30
1.3.4 Stimolazione del sistema immunitario	34
1.3.4.1 Effetto sulla produzione di anticorpi	35
1.3.4.2 Effetti sulla secrezione delle citochine	36
1.3.5 Effetti benefici su allergie alimentari, malattie autoimmuni e tolleranza orale	39
1.3.6 Miglioramento dell'intolleranza al lattosio	43
1.3.7 Prevenzione dell'ipercolesterolemia	44
1.3.8 Prevenzione del cancro	45
2. SCOPO DEL LAVORO	47
3. MATERIALI E METODI	49
3.1. Animali	49

3.2. Preparazione dei batteri	49
3.3. Trattamento sperimentale degli animali	49
3.4. Saggio della risposta di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH)	52
3.5. Preparazione dei linfociti	52
3.6. Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie	52
3.7. Proliferazione linfocitaria in risposta al mitogeno ConA	54
3.8. Proliferazione linfocitaria in risposta all'OVA	55
3.9. Estrazione di RNA dai linfociti	55
3.10. Trascrittasi inversa e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR)	57
3.11. Analisi dei prodotti di PCR	59
3.12. Saggio ELISA	60
3.13. Analisi statistica	60
 4. RISULTATI	 61
4.1. Risposta proliferativa all'OVA	61
4.2. Risposta proliferativa alla ConA	61
4.3. Risposta di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH)	62
4.4. Valutazione dell'espressione delle citochine nei linfociti mesenterici e splenici	62
4.5. Saggio ELISA	64
4.6. Analisi delle popolazioni linfocitarie	64
 5. DISCUSSIONE	 75
6. BIBLIOGRAFIA	84

1. INTRODUZIONE

Lo sviluppo delle barriere difensive si è rivelato un evento essenziale per l'evoluzione, in quanto ha consentito di separare l'ambiente esterno dal sempre più complesso ambiente interno. Tali barriere sono costituite dagli epitelii che rivestono tutte le superfici e le cavità interne e che spesso presentano dei complessi apparati di difesa associati soprattutto a livello dei tratti intestinale, respiratorio ed urogenitale.

La mucosa intestinale è un'enorme superficie esposta continuamente ad un elevato numero di antigeni che giungono nel lume. Il sistema immunitario dell'intestino deve quindi essere in grado di proteggere la mucosa dai patogeni, ma anche di evitare reazioni di ipersensibilità verso le proteine alimentari, la normale flora batterica ed altre macromolecole presenti nell'ambiente intestinale.

Il sistema immunitario della mucosa agisce mediante due principali meccanismi di difesa:

- esclusione immunitaria, realizzata dagli anticorpi secretori, in particolare della classe IgA, che inibisce la colonizzazione dei microrganismi patogeni e l'ingresso nel lume di antigeni nocivi;
- regolazione negativa, atta ad evitare reazioni di ipersensibilità locali e periferiche contro sostanze innocue che vengono a contatto con la superficie della mucosa.

Quando quest'ultimo meccanismo interviene per antigeni alimentari (Brandtzaeg, 1996) e microflora locale (MacDonald, 1995), prende il nome di tolleranza orale. Essa è caratterizzata dalla soppressione specifica della risposta immunitaria

cellulare ed umorale verso un particolare antigene introdotto con gli alimenti o verso la microflora locale, evitando così reazioni immunitarie indesiderate.

E' infatti noto che le reazioni contro gli alimenti hanno una base immunologica e possono essere causate da una rottura della tolleranza verso i componenti della flora intestinale o verso gli alimenti stessi (Strobel, 1998; Chandra, 1997). Si ritiene che come conseguenza della rottura della tolleranza orale potrebbero insorgere risposte immunitarie dirette contro gli autoantigeni che potrebbero condurre allo sviluppo di malattie autoimmuni. L'induzione di uno stato di tolleranza orale è stata pertanto suggerita come strategia per trattare alcune malattie autoimmuni nell'uomo (Weiner, 1997) e per sopprimere quelle indotte sperimentalmente in modelli animali quali: la miastenia grave (Baggi et al., 1999), l'uveite (Krause et al., 2000), l'artrite reumatoide (Meyer, 2000), l'encefalomielite (Whittrache et al., 1991) e la colite (Gotsman et al., 2001).

Lo sviluppo del sistema immunitario della mucosa e della tolleranza orale può essere influenzato da molte variabili. Un'alterata permeabilità epiteliale, che porta ad un maggiore ingresso di antigeni nel lume intestinale, è uno dei fattori principali nello sviluppo di gravi disturbi della mucosa, quali le allergie alimentari. Altri fattori che influiscono sono l'età dell'individuo, la dose di antigene alimentare introdotta e lo sviluppo di un'equilibrata microflora intestinale (Brandtzaeg, 1997). Il ruolo di quest'ultima è stato molto rivalutato da quando sono stati evidenziati gli effetti benefici svolti da batteri di origine enterica definiti probiotici. Negli ultimi anni è infatti cresciuto notevolmente l'interesse per la somministrazione orale dei probiotici e recentemente è stato suggerito il loro utilizzo per prevenire le allergie alimentari.

Alla luce di ciò si può affermare che per un corretto funzionamento della barriera intestinale è necessaria una continua e fine interazione tra sistema immunitario della mucosa e microflora. Il mancato o errato funzionamento di un costituente di questo sistema altamente integrato causa la distruzione della barriera mucosale, provocando così il passaggio indiscriminato di contenuto luminale attraverso le giunzioni epiteliali, con conseguente rottura della tolleranza orale ed insorgenza di infiammazione (Gordon *et al.*, 1997).

Risposta immunitaria

Il sistema immunitario agisce mediante due tipi di risposta:

- la risposta non specifica o innata, che costituisce la prima linea di difesa ed opera in modo non selettivo verso antigeni estranei;
- la risposta specifica o acquisita, che viene invece stimolata in seguito ad esposizione ad antigeni specifici.

La scelta di una delle due risposte è dettata dalla natura dell'antigene. Tuttavia, una risposta immunitaria completa richiede la partecipazione coordinata di entrambe (Gill & Guarner, 2004).

La risposta immunitaria innata è mediata da proteine recettoriali appartenenti alla classe dei pattern recognition receptors (PPR), che riconoscono dei motivi strutturali conservati espressi dai microorganismi, i microbial associated molecular patterns (MAMP; Medzhitov & Janeway, 2000). In particolare, il tipo di PPR che riconosce i MAMP è costituito dai toll-like receptors (TLR), una famiglia di proteine transmembrana espresse soprattutto sulla superficie delle cellule immunocompetenti, ossia monociti, macrofagi e cellule dendritiche, ma anche sulla superficie delle cellule epiteliali (Cario *et al.*, 2002). Un altro tipo di PPR sono le molecole nucleotide-binding oligomerization domain (Nod) presenti nel citoplasma di cellule epiteliali ed immunitarie (MacDonald and Monteleone, 2005).

Quando l'intestino si trova in un buon stato di salute, i TLRs ne proteggono la barriera epiteliale e conferiscono la tolleranza verso i batteri commensali; i Nod esercitano una azione antimicrobica e prevengono l'invasione dei patogeni. Insieme

contribuiscono a mantenere la tolleranza verso antigeni innocui e ad inibire le risposte allergiche contro le proteine alimentari (Cario, 2005).

Il legame tra i PPR ed i MAMP può attivare la cascata del complemento, stimolare la fagocitosi ad opera di monociti, macrofagi e polimorfonucleati, oppure indurre la trascrizione genica tramite l'attivazione di nuclear factor- κ B (NF- κ B), che a sua volta attiva una cascata di eventi che porta alla risposta infiammatoria. Considerando che tra i MAMP riconosciuti dai TLR si trovano i lipidi della parete cellulare ed il peptidoglicano (Akira and Takeda, 2004), che non sono specifici dei patogeni ma anche dei batteri commensali, ancora non è chiaro come l'ospite distingue tra i due tipi di microrganismi. Si è ipotizzato che la mancanza di infiammazione in risposta alla microflora sia possibile in quanto i prodotti dei batteri commensali stimolano i TLR ed innescano un signaling che conduce alla produzione di fattori citoprotettivi, quali l'interleukin (IL)-6, la IL-10, e il tumor necrosis factor (TNF)- α , che svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi dell'epitelio intestinale (Rakoff-Nahoum, 2004).

La risposta immunitaria specifica è caratterizzata dall'espansione clonale dei linfociti B e T in risposta ad un antigene esposto dalle cellule presentanti l'antigene (APC). I linfociti B secernono anticorpi (risposta umorale), mentre i linfociti T coadiuvano le cellule B nella secrezione di anticorpi (T helper, Th) e mediano le difese dell'ospite, eliminando i patogeni intracellulari e uccidendo le cellule infettate da virus (T citotossici, Gill & Guarner, 2004).

Le cellule Th possono svilupparsi in Th di tipo 1 (Th1) o di tipo 2 (Th2), in base al contesto in cui avviene la presentazione antigenica da parte delle APC. Il differenziamento dei diversi tipi cellulari dipende dalle citochine presenti

nell'ambiente al quale sono esposte le cellule Th durante la loro attivazione (Abbas et al., 1996). Le citochine sono delle proteine secrete che indirizzano e coadiuvano la risposta immunitaria; inoltre, contribuiscono a varie funzioni cellulari, come la crescita, il differenziamento e l'emopoiesi (Hanada & Yoshimura, 2002). Il pattern di secrezione delle citochine da parte delle APC determina il "destino" del differenziamento dei linfociti T (Simecka, 1998). Le due classi di linfociti Th attuano una risposta differente caratterizzata dalla secrezione di diverse citochine e dalla differente regolazione della secrezione di immunoglobuline.

La risposta Th1 si instaura in microambienti in cui le APC producono IL-12. Questa citochina induce i linfociti T a secernere interferon (IFN)- γ , da cui si innescano le risposte cellulo-mediate. Altre citochine importanti che vengono attivate in questa cascata, classicamente definite come pro-infiammatorie, sono la IL-1, il TNF- α e la IL-8, che richiama i neutrofili dal circolo sanguigno al sito di infezione (Baggiolini et al. 1995).

La risposta Th2 porta invece alla produzione delle citochine IL-4, IL-5 e IL-13, che richiamano soprattutto eosinofili e mastociti. La IL-4 ha un ruolo fondamentale nello stimolare lo "switching" isotipico delle immunoglobuline da IgA/IgG verso IgE, espresse in modo particolare nelle infezioni parassitarie e nelle allergie. Da numerosi studi (Lin et al., 1991; Beagley et al., 1989) si è visto che aggiungendo ai linfociti B le citochine secrete dalle cellule Th2, quali IL-4, IL-5, IL-6, o IL-10, la produzione *in vitro* delle IgA veniva aumentata. In particolare, si è visto che la IL-4 svolge un ruolo determinante nell'induzione di una risposta contro le reazioni allergiche stimolando la produzione di IgE (Mosmann and Coffman, 1989; Finkelman et al., 1991). E' stato anche dimostrato che la IL-6 è una citochina

essenziale per l'induzione della risposta mediata da IgA, in quanto è in grado di promuovere il differenziamento dei linfociti B in plasmacellule (Okada et al., 1994). Inoltre la quantità di plasmacellule secernenti IgA nell'intestino, nei linfonodi mesenterici e nei polmoni di topi knockout per la IL-6 risultava inferiore di circa 50-60% rispetto a quella posseduta dai topi wild-type (Ramsay et al., 1994).

Da alcuni anni sono state identificate altre classi di linfociti T con funzioni di tipo regolatorio (T_{reg}). Esse sono in grado di sopprimere alcune risposte immunitarie indesiderate e mantenere uno stato di tolleranza immunologica.

Una classe di T_{reg} è costituita dalle cellule Th3, caratterizzate da elevata produzione di transforming growth factor (TGF)- β e la cui induzione ed espansione è favorita dalla presenza della stessa citochina nell'ambiente a cui sono esposte le cellule (Chen et al., 1994; Weiner, 2001). I linfociti della classe Th3 vengono stimolati dalle APC e costimolati dalle cellule dendritiche (DC). La presenza di TGF- β risulta fondamentale in quanto stimola le DC e le APC ad indurre l'espansione di tali cellule (Kosiewicz et al., 1998; Iwasaki and Dinarello, 1999; Weiner, 2001).

Un'altra classe di linfociti con fenotipo regolatorio è quella delle cellule T regolatorie 1 (Tr1) caratterizzata da elevata secrezione di IL-10 e bassa espressione di IL-12 e IL-4; tali cellule hanno inoltre bassa capacità proliferativa in risposta a stimolazione antigenica (Groux et al., 1997). Oltre alle cellule Tr1, i linfociti T $CD4^+$ che esprimono costitutivamente la catena α del recettore per la IL-2 (CD 25) sono in grado di sopprimere la proliferazione e di secernere elevate quantità di IL-10 (Levings et al., 2002). I linfociti della classe Tr1 e quelli che esprimono contemporaneamente sulla membrana il CD4 e il CD25 sono simili sotto molti

aspetti e non si può escludere che esse siano in realtà la stessa popolazione (Roncarolo et al., 2001).

Nella Figura 1 sono mostrati schematicamente regolazione e funzione dei subsets cellulari dei linfociti T helper.

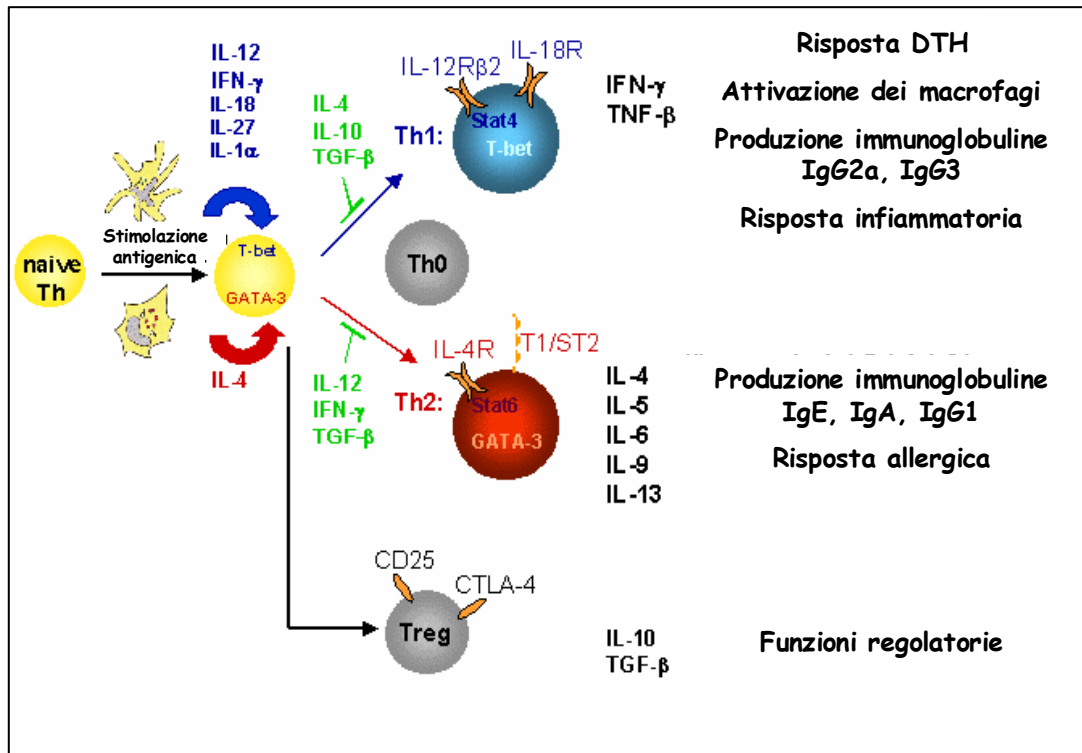


Fig.1: Regolazione e funzione dei subsets cellulari dei linfociti T

I linfociti T helper (Th) possono differenziarsi in Th di tipo 1 (Th1) o di tipo 2 (Th2), in base al contesto in cui avviene la presentazione antigenica da parte delle APC. Il differenziamento dei diversi tipi cellulari dipende dalle citochine presenti nell'ambiente al quale sono esposte le cellule Th durante la loro attivazione. Ciascuno dei due subsets cellulari è derivato da un clone di cellule T helper meno differenziato: Th0. Le cellule Th1 si sviluppano in un ambiente ricco in IL-12, mentre le Th2 in un ambiente ricco in IL-4. Le cellule Th1 producono citochine che promuovono l'immunità cellulo-mediata, che include l'attivazione dei macrofagi, la risposta DTH e la risposta delle cellule T citotossiche. Al contrario, le cellule Th2 sono responsabili della risposta immunitaria umorale attraverso la secrezione di citochine specifiche e sono coinvolte nella risposta allergica. Inoltre le cellule Th1 producono IFN-γ che inibisce il differenziamento delle cellule Th2, mentre la IL-4, prodotta dalle cellule Th2, sopprime la risposta Th1. La presenza di un ambiente ricco in citochine soppressorie/regolatorie, conduce alla generazione di diversi tipi di cellule Treg antigene-specifiche, che vengono definite dal loro fenotipo e dalla loro capacità di produrre citochine regolatorie quali TGF-β e IL-10.

Intestino

Come detto in precedenza, l'intestino costituisce una barriera tra l'organismo e le sostanze introdotte con la dieta.

Il ruolo principale della mucosa dell'intestino tenue è di realizzare la digestione e l'assorbimento dei nutrienti. Per assolvere a questo compito, la mucosa è organizzata in pliche, villi e microvilli; strutture che nel loro insieme contribuiscono ad aumentare di 500-600 volte la superficie assorbente. I villi sono estroflessioni digitiformi della mucosa, che si proiettano verso il lume intestinale. Essi sono rivestiti da epitelio prismatico semplice di cellule, chiamate enterociti, la cui membrana apicale si espande a formare i microvilli che costituiscono il tipico orletto a spazzola.

L'intestino, con la sua enorme superficie, interfaccia tra l'ambiente esterno e quello interno, è continuamente esposto ad una miriade di antigeni per cui, oltre al suo ruolo primario dell'assorbimento delle sostanze nutritive presenti negli alimenti, deve anche fornire una difesa contro le sostanze potenzialmente dannose, come agenti nocivi, patogeni e radicali liberi.

Uno dei meccanismi di difesa è rappresentato dalla barriera mucosale. Questo meccanismo inizia nella bocca e nello stomaco, dove gli enzimi proteolitici e il pH acido costituiscono un potente sistema per rompere i polipeptidi potenzialmente immunogenici in piccoli peptidi scarsamente immunogenici, prevenendo così l'insorgenza di risposte immunitarie indesiderate. A livello intestinale si trova invece lo strato di muco secreto dalle cellule caliciformi, una prima barriera difensiva contro eventuali patogeni introdotti con l'alimentazione, in quanto crea una barriera fisica e contrasta l'adesione di patogeni eventualmente presenti nel

lume. Antigeni, virus e batteri rimangono intrappolati nello strato di muco, non riescono a raggiungere il sottostante strato epiteliale e vengono dunque espulsi con i movimenti peristaltici intestinali: tale processo viene chiamato esclusione non immune (Mayer, 2003).

Oltre allo strato di muco, lungo tutto l'intestino è presente il tessuto linfoide associato all'intestino (gut associated lymphoid tissue, GALT), che rappresenta il tessuto linfoide più esteso di tutto l'organismo, considerata l'enorme superficie della mucosa intestinale cui è associato.

Esso è composto principalmente da:

- follicoli linfatici organizzati, chiamati placche del Peyer, disseminate lungo tutto l'intestino, ma con un maggior numero nel colon e nel retto;
- linfociti della lamina propria;
- linfociti intraepiteliali;
- linfonodi mesenterici (Simecka, 1998).

Tramite meccanismi complessi, il GALT è in grado di rimuovere i patogeni, eliminare le cellule infettate e sviluppare una memoria immunologica capace di indurre una più rapida risposta in seguito ad esposizione allo stesso antigene.

Nella Figura 2 viene illustrata la barriera difensiva associata all'intestino.

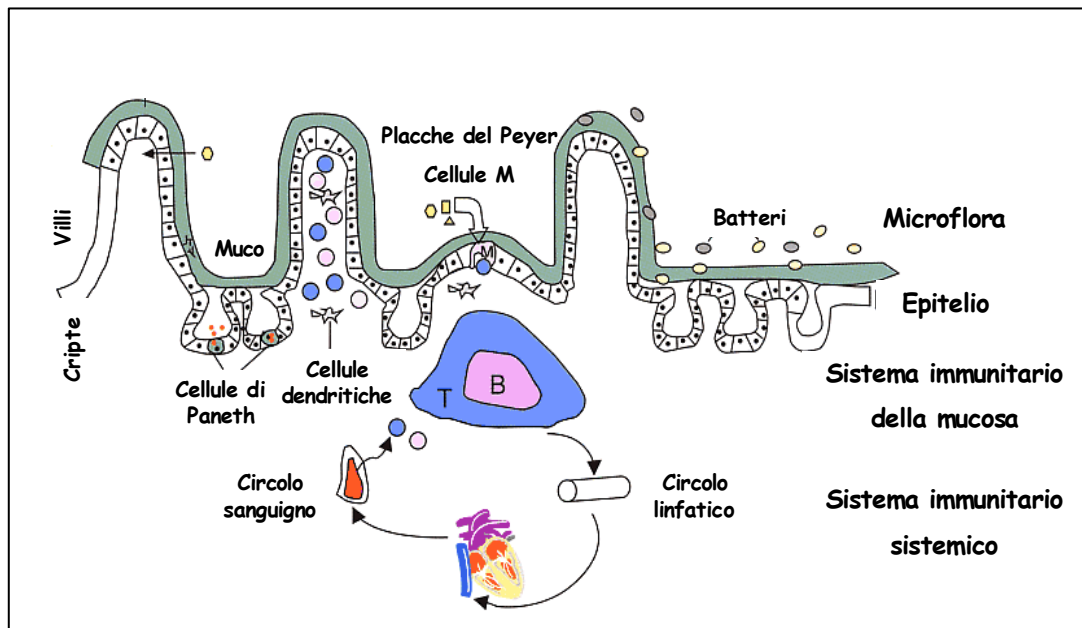


Fig.2: Illustrazione della barriera difensiva dell' intestino

L'intestino è ricoperto da un film di muco protettivo prodotto degli enterociti. Alla base delle cripte si trovano delle cellule specializzate, le cellule di Paneth, in grado di rilasciare molecole antimicrobiche nel lume intestinale. La flora intestinale, presente maggiormente nel colon, costituisce una barriera naturale contro i patogeni. Il sistema immunitario intestinale comprende linfociti disseminati sotto l'epitelio ed organizzati in follicoli linfatici con una regione centrale di linfociti B ed una periferica di linfociti T. Al di sopra dei follicoli si trovano le cellule M, specializzate nel trasporto delle particelle dal lume ai follicoli stessi. Queste aree dell'intestino sono note come placche del Peyer. Quando i linfociti vengono attivati dalle cellule dendritiche che presentano l'antigene, lasciano la mucosa ed entrano nel circolo sanguigno mediante il dotto toracico. I linfociti così attivati colonizzano in seguito sia la mucosa stessa che altri siti mucosali.

Immunità intestinale

Gli enterociti sono le cellule responsabili dell'assorbimento, quindi interagiscono permanentemente con il contenuto del lume intestinale ed entrano a stretto contatto con un numero elevato di antigeni, tra i quali anche batteri o molecole nocive per l'organismo. Gli enterociti sono considerati parte integrante della risposta innata del sistema immunitario intestinale, infatti rappresentano il primo contatto con gli antigeni luminali e con i microorganismi, sia commensali che patogeni. Inoltre, gli enterociti possono funzionare da APC "non professionali", presentando alle cellule T della lamina propria antigeni parzialmente processati (Mayer, 2003). In seguito ad interazione della loro superficie apicale con antigeni luminali, gli enterociti possono

secernere dalla loro superficie basolaterale un'ampia varietà di citochine e chemiochine, che attivano il reclutamento delle cellule immunitarie dai diversi microambienti intestinali, le quali inducono un'attiva risposta immunitaria. Un ruolo appropriato per gli enterociti è dunque quello di adattare la reattività fisiologica dei tessuti dell'ospite ad un contenuto intestinale continuamente mutevole. Disfunzioni di questo sistema possono portare ad una discordanza tra i segnali provenienti dal lume e l'insorgenza della risposta immunitaria, che potrebbe causare una iper-reattività patologica nei confronti di antigeni non pericolosi, come accade nelle allergie alimentari o nelle infiammazioni croniche intestinali.

Diffuse nella mucosa si trovano le placche del Peyer, che rappresentano i "siti induttivi", ossia i siti principali dove avviene la presentazione antigenica e la risposta immunitaria intestinale viene innescata. Le placche del Peyer sono ricoperte da uno strato epiteliale contenente cellule membranose specializzate, le cellule M, responsabili del trasporto all'interno delle placche di antigeni, batteri e macromolecole derivanti dal lume intestinale (O'Leary e Sweeney, 1986). Le cellule M non hanno né orletto a spazzola né glicocalice: sono dotate di un esteso sistema di vescicole endocitotiche e di un'ampia tasca intraepiteliale, dove vengono rilasciate le vescicole contenenti gli antigeni provenienti dal lume (Kraehenbuhl & Neutra, 2000). Nella tasca sono presenti anche le APC, essenzialmente DC e monociti, che acquisiscono il materiale trasportato dalle cellule M e presentano l'antigene ai linfociti B e T "naive", presenti nel sottostante strato sottoepiteliale, organizzati in follicoli linfatici. Le DC sono APC professionali in grado di esporre gli antigeni luminali anche attraverso altre modalità: nella lamina propria, possono prendere direttamente antigeni dal lume, in quanto sono in grado di interdigitarsi tra

le cellule epiteliali; oppure possono prendere gli antigeni luminali che superano la barriera intestinale tramite delle “aperture” transienti in essa (Hart *et al.*, 2002).

In seguito alla presentazione antigenica, i linfociti B e T vengono attivati dall'antigene e indotti a proliferare e a differenziare in linfociti che esprimono le integrine $\alpha 4\beta 7$, con funzioni effettrici o di memoria. I linfociti abbandonano le placche del Peyer tramite la circolazione linfatica, raggiungono il sangue periferico e migrano verso i cosiddetti “siti effettrici” intestinali ed extraintestinali, quali i polmoni, i tratti aerei ed urogenitali, dove si svolgerà la risposta immunitaria. A livello intestinale i linfociti B e T attivati si indirizzano essenzialmente in tre diversi compartimenti linfoidi: la lamina propria, l'epitelio della mucosa e i linfonodi mesenterici, dove svolgono le loro attività specifiche, quali la sintesi degli anticorpi e l'eliminazione dei patogeni (Brandtzaeg, 1998).

I linfociti B della lamina propria producono essenzialmente IgA. La funzione principale delle IgA è di contribuire alla funzione della barriera intestinale, infatti agiscono come prima linea di difesa, legandosi agli antigeni, neutralizzandoli e rimuovendoli dalla mucosa senza innescare una risposta infiammatoria, in quanto non si legano al complemento (esclusione immune degli antigeni dalla superficie epiteliale). Gli antigeni che riescono ad aggirare questa prima linea di difesa e raggiungono la lamina propria incontrano le IgG e i complessi immuni che ne derivano attivano il sistema del complemento e innescano la risposta infiammatoria. I linfociti T della lamina propria sono cellule effettrici, essenzialmente $CD4^+$ con fenotipo helper/induttore che innescano la risposta immunitaria cellulare secernendo numerose citochine e chemiochine come mediatori di tale risposta.

I linfociti intraepiteliali, essenzialmente CD8⁺ con fenotipo soppressore/citotossico sono presenti negli spazi tra gli enterociti sopra la membrana basale, definito spazio sotto epiteliale. Questi rappresentano i primi componenti del sistema immunitario intestinale esposti ad antigeni alimentari e microbici. E' stato suggerito per i linfociti intraepiteliali un ruolo importante nella protezione contro i patogeni epiteliali, nella riparazione dei tessuti intestinali danneggiati e nel controllo dei tumori epiteliali (Hayday et al., 2001; Cheroutre, 2004).

I linfonodi mesenterici rappresentano l'ultimo distretto linfoide in cui migrano le cellule dalle placche del Peyer. Questi vengono popolati soprattutto da DC e macrofagi, che presentano l'antigene ai linfociti ivi residenti. Tale interazione favorisce il differenziamento delle plasmacellule in linfociti B, che vengono rilasciati nel torrente circolatorio e, tramite l'endotelio vascolare intestinale, raggiungono la lamina propria, dove secernono le IgA.

Responsabili di questo processo di localizzazione linfocitaria sono le cellule dell'endotelio vascolare, le quali esprimono le molecole di adesione MadCAM (mucosal addressin cell adhesion molecule) in grado di riconoscere le integrine $\alpha 4\beta 7$ presenti sui linfociti, che in tal modo vengono richiamati nel torrente circolatorio (Simecka, 1998; Campbell et al., 2003). Le cellule endoteliali agiscono quindi da sentinelle per il reclutamento di linfociti nei tessuti danneggiati o infettati. La migrazione dei linfociti stimolati nella mucosa intestinale (sito induttore) verso altri tessuti mucosali di tutto il corpo (siti effettori), suggerisce l'idea di un "common mucosal immune system" (Simecka, 1998).

Nella Figura 3 è mostrato uno schema riassuntivo di questo fenomeno.

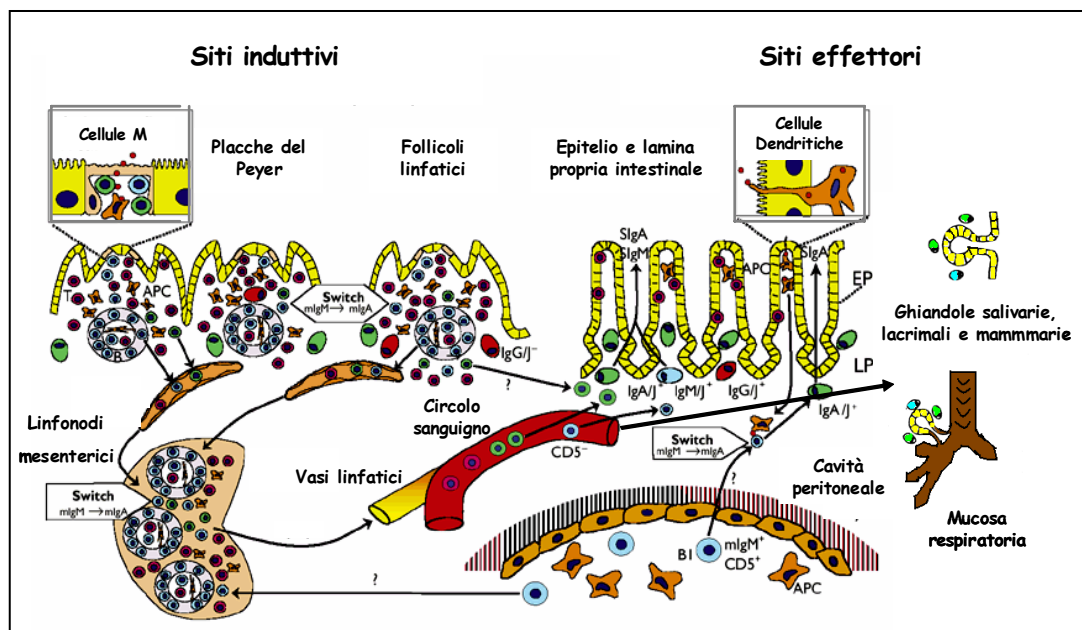


Fig.3: Rappresentazione schematica del sistema immunitario intestinale

I siti induttivi per i linfociti T e B sono costituiti dal tessuto linfoide associato all'intestino (GALT), che comprende le placche del Peyer, fornite di cellule M per la presentazione antigenica, le aree T, i follicoli B e le cellule presentanti l'antigene (APC). Lo "switching" isotipico da IgM a IgA avviene nel GALT e nei linfonodi mesenterici; da cui i linfociti B e T attivati dall'antigene localizzano, attraverso i vasi linfatici e i capillari, ai siti effettori della mucosa intestinale, ossia la lamina propria (LP) e l'epitelio (EP) e ad altri distretti mucosali. I linfociti B attivati possono anche migrare dai follicoli isolati direttamente alla LP. Le cellule IgA⁺ differenziano in plasmacellule che producono IgA secretoria (SIgA). L'inserto in alto a sinistra della figura mostra in dettaglio una cellula M e la sua "tasca" contenente vari tipi cellulari. L'inserto in alto a destra mostra una DC che si interdigita tra due cellule epiteliali e contatta l'antigene direttamente dal lume.

Tolleranza orale

Ogni giorno, tramite gli alimenti, vengono introdotte nell'organismo molte proteine animali e vegetali, alcune delle quali possono essere potenzialmente nocive. Il sistema immunitario gastrointestinale deve essere quindi in grado di discriminare tra agenti dannosi e sostanze innocue. Un'errata risposta contro gli antigeni alimentari potrebbe provocare ipersensibilizzazioni agli alimenti che possono essere causa di patologie a livello intestinale. Tuttavia, grazie alla capacità del sistema immunitario intestinale di discriminare gli antigeni alimentari da quelli di importanza immunologica tramite il processo definito tolleranza orale, queste situazioni non

sono molto frequenti. La tolleranza orale è caratterizzata da soppressione della risposta immunitaria specifica, cellulare e/o umorale, verso un particolare antigene introdotto con gli alimenti.

Una definizione più precisa del termine tolleranza orale è stata suggerita da Weiner (2001) quale “meccanismo mediante il quale una possibile risposta immunitaria offensiva è prevenuta, soppressa o deviata verso una gamma di risposte immunitarie non offensive.” La tolleranza orale, quindi, è un meccanismo immunologico che si sviluppa per trattare come componenti interni gli agenti esterni che hanno accesso alle cellule seguendo una via naturale.

Uno dei requisiti fondamentali per mantenere la tolleranza orale è l'integrità della mucosa. Infatti, in individui con disordini intestinali che portano ad una maggior permeabilità alle macromolecole, come la celiachia e il morbo di Crohn, si ha un aumento della risposta anticorpale agli alimenti.

Per indurre la tolleranza orale e verificarne sperimentalmente l'avvenuta induzione, si somministra oralmente ad animali da laboratorio una proteina che non hanno mai incontrato prima come antigene, e poi si inietta la stessa proteina per via intraperitoneale per amplificare l'eventuale risposta immunitaria. Le proteine usate possono essere a carattere antigenico, come l'ovalbumina (OVA), o a carattere immunogenico, quali la proteina basica della mielina (MBP) e il collagene (Weiner, 1997; Strobel and Mowat, 1998; Mowat, 1994; Brandtzaeg, 1998; Mayer, 2000; Husby, 2000). Fino ad ora è stato possibile instaurare la tolleranza orale in animali da esperimento con tutte le proteine utilizzate (Simeka, 1998).

Meccanismi coinvolti nell'induzione della tolleranza orale

Inizialmente si pensava che la tolleranza fosse dovuta semplicemente a meccanismi di discriminazione self-nonself, ad oggi è invece dimostrato che essa è dovuta a tre meccanismi diversi: anergia, delezione clonale, soppressione attiva. Questi meccanismi hanno differenti modalità di induzione e possono agire insieme o separatamente (Chen et al., 1995; Friedman e Weiner, 1994; Lundin et al., 1999). Esistono numerosi studi che indicano che la dose di antigene somministrato è importante per determinare quale tipo di meccanismo verrà indotto. Alcuni autori hanno messo in evidenza che elevate dosi di antigene inducono anergia e delezione clonale (Chen et al., 1995), mentre la somministrazione di basse dosi di antigene induce la soppressione attiva mediata da citochine. Tuttavia esistono anche degli studi che indicano che la delezione clonale e la soppressione attiva possono essere presenti nello stesso tempo negli animali tolleranti (Lundin et al., 1999; Marth et al., 1996).

Questi meccanismi servono essenzialmente per eliminare l'attività e/o le cellule che possono essere reattive nei confronti dell'antigene a cui l'organismo è reso tollerante. Se non viene indotta la tolleranza nei confronti di proteine alimentari, si ha la comparsa di patologie a carico del sistema immunitario intestinale dirette contro antigeni esterni o autoantigeni, e quindi lo sviluppo di malattie autoimmuni.

La delezione clonale interviene principalmente durante le fasi di sviluppo nella zona midollare del timo, dove le cellule T vanno incontro ad apoptosi dopo aver interagito con l'antigene self presentato dalle APC. Questo processo in età adulta può avvenire nei tessuti linfoidei periferici come il GALT, dove può verificarsi la morte per apoptosi delle cellule reattive all'antigene verso cui l'organismo è

tollerante. Alcuni membri della famiglia delle interleuchine possiedono la proprietà di regolare l'apoptosi. Ad esempio la IL-2 sembrerebbe in grado di bloccare l'apoptosi delle cellule T (Ayroldi et al., 1998), anche se ci sono in proposito pareri ancora contrastanti. Infatti studi effettuati su topi in cui il gene per la IL-2 era deletato, hanno dimostrato che si avevano una iperproliferazione linfocitaria e lo sviluppo di manifestazioni a carattere autoimmunitario (Rafaeli et al., 1998). Questi risultati portavano quindi a ritenere la IL-2 come una citochina che stimola l'apoptosi.

Altri studi invece, indicavano che la IL-12 interviene nella inibizione della morte cellulare programmata dei linfociti di tipo Th1. Ciò è stato dimostrato utilizzando degli anticorpi anti-IL-12, che portavano ad un aumento delle cellule in apoptosi negli organi linfoidi periferici (Marth et al., 1999).

Un altro meccanismo che può intervenire nell'induzione della tolleranza orale è l'anergia, un processo per cui la cellula non risponde più ad un antigene presentato dalle APC, che invece avrebbe dovuto stimolarla, e si ha inattivazione del clone ma non la sua morte. Questo meccanismo interviene soprattutto quando l'antigene è presentato da APC non professionali, quali cellule endoteliali o enterociti.

L'ultimo meccanismo coinvolto nell'acquisizione della tolleranza orale è la soppressione attiva mediata da citochine dove la tolleranza è raggiunta grazie alla secrezione di citochine soppressorie/regolatorie quali IL-10 e TGF- β . Si ipotizza che, in seguito alla presentazione dell'antigene da parte delle APC delle placche del Peyer, ed in presenza di un ambiente ricco in citochine soppressorie/regolatorie, vengono generati diversi tipi di cellule T_{reg} che vengono definiti in base al loro fenotipo ed alla loro capacità di produrre citochine regolatorie (Allez and Mayer,

2004). Queste cellule T_{reg} sono antigene specifiche e migrano verso gli organi linfoidi e gli organi bersaglio per sopprimere sia le risposte immunitarie specifiche per l'antigene che quelle non specifiche mediante il rilascio di citochine quali il TGF- β e la IL-10, con conseguente riduzione dei processi infiammatori (bystander suppression; Weiner, 2001).

Studi effettuati su cloni di cellule T di topi sottoposti a tollerizzazione orale hanno dimostrato l'importante ruolo ricoperto dalle cellule Th3, che producono TGF- β , nell'induzione della tolleranza orale. Questi cloni erano in grado di sopprimere risposte immunitarie dopo un processo di trasferimento in altri topi, e ciò era accompagnato da un incremento di TGF- β , IL-10 e IL-4 (Chen et al., 1994).

Questo ha suggerito l'importanza e il legame di tali citochine con il processo di tollerizzazione. Gonnella et al. (1998) notarono che l'espressione basale di IL-4, TGF- β e IL-10 presente a livello della mucosa intestinale, aumentava poco tempo dopo la somministrazione orale di un antigene. Alcuni autori hanno dimostrato che TGF- β è essenziale per indurre la tolleranza, mentre non lo sono IL-4 e IL-10, osservando che la tolleranza veniva indotta sia in topi knockout per IL-4 (Garside et al., 1995), sia durante la somministrazione di anticorpi anti-IL-10 (Aroeira et al., 1995). I risultati di Tsuji et al. (2001) invece sostengono l'essenzialità della IL-10 per il processo d'induzione della tolleranza. Questi autori infatti, notarono uno spiccato aumento di IL-10 nelle cellule delle placche del Peyer derivanti da topi alimentati con β -lattoglobulina, mentre i livelli di IL-4 e TGF- β non differivano significativamente da quelli riscontrati nei controlli a cui non veniva somministrato oralmente l'antigene.

La classe di linfociti $CD4^{+}$ che esprime costitutivamente il $CD25^{+}$ risulta essenziale per il processo di induzione della tolleranza sia verso antigeni alimentari (tolleranza orale), sia verso autoantigeni (malattie autoimmuni), che verso gli organi trapiantati (tolleranza al trapianto; Chen and Wahl 2003). E' stato infatti visto che la somministrazione orale di OVA a dei topi attivava la produzione di cellule T_{reg} che producevano IL-10, suggerendo un loro possibile ruolo nell'induzione della tolleranza orale (Zhang et al., 2001).

Inoltre, le cellule Tr1, che producono alti livelli di IL-10, venivano attivate in seguito a somministrazione orale di myelin basic protein (MBP) in un modello animale che mima la sclerosi multipla umana (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) e portavano ad uno stato di tolleranza verso il peptide con conseguente diminuzione della malattia (Wildbaum et al., 2002). Altri autori notarono un aumento delle cellule $CD4^{+}$ - $CD25^{+}$ e dell'espressione della IL-10 in topi con artrite indotta dal collagene di tipo II (CIA), modello che mima l'artrite reumatoide umana, cui veniva somministrato oralmente tale collagene per ottenere la tolleranza verso l'antigene causa della malattia (Min et al., 2004).

Probiotici

L'interazione degli enterociti con la microflora batterica è fondamentale per lo sviluppo del GALT e di una corretta barriera intestinale (Kalliomaki et al 2001). Tale cooperazione promuove l'integrità dell'intestino e previene disfunzioni a livello cellulare (Donnet-Hughes et al., 1999; Bouhnik et al., 1992; Goldin et al., 1992; Ouwehand et al., 2002). La normale colonizzazione dell'intestino da parte dei batteri commensali contribuisce allo sviluppo del sistema immunitario della mucosa. In assenza di microflora, infatti il sistema immunitario intestinale non si sviluppa correttamente e la morfologia intestinale risulta notevolmente alterata (Lu & Walker, 2001). E' stato infatti osservato che nei topi germ-free le placche del Peyer sono poche, scarsamente sviluppate e mancanti di centri germinali, e risulta ridotto il numero di plasmacellule secernenti IgA, di linfociti CD4 a livello della lamina propria e di linfociti intraepiteliali. Quando però l'equilibrio della microflora intestinale viene ripristinato, si ha il ritorno ad un'esatta composizione del sistema immunitario della mucosa (Klaasen et al., 1993; Umesaki et al., 1995).

L'intestino dell'embrione è sterile, e la colonizzazione del tratto gastrointestinale inizia durante il parto, quando il neonato viene a contatto con i batteri della microflora materna e con quelli ambientali. Nel corso dell'allattamento e della prima infanzia la microflora raggiunge una composizione che rimane pressoché stabile nel corso della vita, ma che può subire cambiamenti in risposta a diversi fattori, quali alterazioni nella dieta, stato di salute dell'individuo e condizioni ambientali. Questa microflora normalmente non è patogena e contribuisce a mantenere lo stato di salute dell'ospite, facilitando l'assorbimento dei nutrienti,

degradando sostanze potenzialmente dannose o proteine allergeniche e generando risposte immunitarie tali da evitare infiammazione a livello intestinale (Chin et al., 2000).

E' stato visto che tra i componenti della flora intestinale, i batteri produttori di acido lattico, quali i bifidobatteri ed i lattobacilli, sono in grado di esercitare effetti benefici per la salute dell'ospite. Questi batteri, chiamati probiotici, sono definiti come "microrganismi vivi che, usati in numero sufficiente come supplemento alimentare, arrecano effetti benefici all'ospite modificandone la microflora intestinale" (Ouwehand et al., 2002).

I probiotici devono essere in grado di sopravvivere al transito gastrico e colonizzare, anche transientemente, la mucosa intestinale per integrarsi con i batteri enterici in modo da mantenere o indurre una sana microflora intestinale.

Tra i probiotici definiti mediante questi criteri, i più usati e studiati sono: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* (ceppo Shirota), *L. casei* subsp. *rhamnosus* GG, *L. johnsonii* LJ1, *L. reuteri*, *Bifidobacterium bifidus*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. adolescentis* e *B. infantis*.

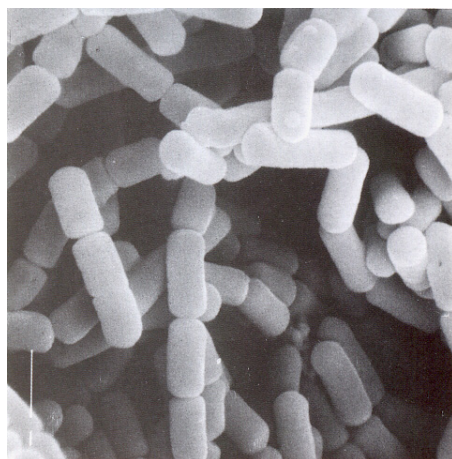


Fig. 4: Lattobacilli

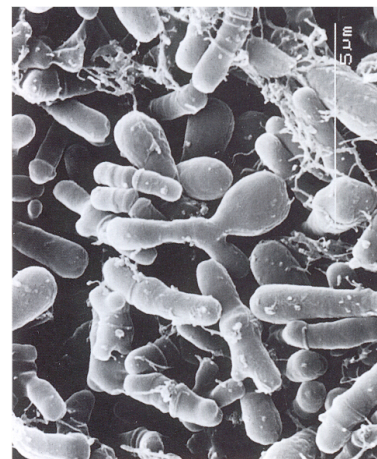


Fig. 5: Bifidobatteri

Un numero sempre crescente di studi ha messo in evidenza che i batteri probiotici sono in grado di influenzare positivamente lo stato di salute, grazie alle numerose attività da loro svolte, in particolare: il mantenimento di un giusto equilibrio nella microflora intestinale, la protezione contro patogeni intestinali e la modulazione della risposta immunitaria che sembrano portare ad un miglioramento nelle allergie alimentari, disturbi autoimmuni e tolleranza orale (Ballongue 1993; Fuller 1989; Salminen et al., 1996; Sanders 1993; Walker and Duffy 1998).

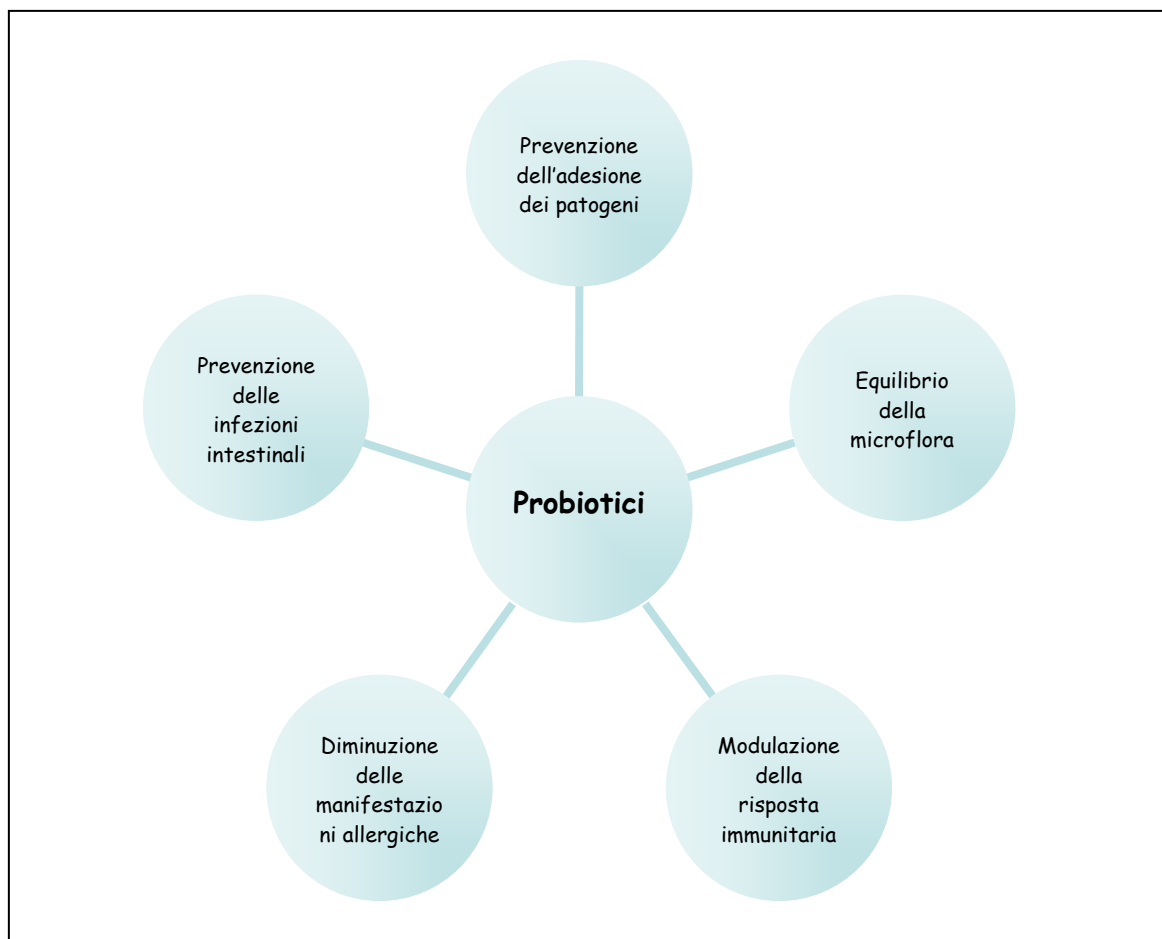


Fig.6: Principali effetti benefici esercitati dai probiotici

Capacità di colonizzazione del tratto intestinale

La capacità di colonizzare, anche transientemente, il tratto gastrointestinale con organismi non patogeni che possono avere effetti benefici per la salute dell'ospite, è un obiettivo che ci si è prefissati già da molti anni. I lattobacilli ed i bifidobatteri, usati in molte preparazioni alimentari, sono considerati buoni candidati per raggiungere questo obiettivo.

La sopravvivenza dei probiotici nelle feci dell'individuo è indice di un'ampia colonizzazione intestinale. Vari probiotici sono stati esaminati per quanto riguarda la loro sopravvivenza durante il transito intestinale. Alcuni autori hanno dimostrato che *L. johnsonii* La1 è in grado di sopravvivere al passaggio intestinale e si ritrova nelle feci degli individui cui era stato somministrato (Donnet-Hughes et al., 1999). Anche vari bifidobatteri introdotti con prodotti di latte fermentato sono stati ritrovati nelle feci di volontari (Bouhnik et al., 1992). E' stato visto che *L. casei* GG continuava ad essere presente nelle feci di volontari fino a due settimane dopo la sospensione della somministrazione (Goldin et al., 1992). Schiffrin et al. (1995) hanno visto che, in seguito a somministrazione di *L. acidophilus* ceppo La1 o *B. bifidum* ceppo Bb12 a gruppi di volontari, i probiotici perduravano nelle feci fino a sei settimane dopo la sospensione del trattamento.

Un altro batterio che è risultato in grado di sopravvivere al transito intestinale è il *B. animalis*, in quanto è stato trovato nelle feci di ratti precedentemente trattati con lo stesso batterio, fino ad una settimana dopo la fine della somministrazione. La quantità di *B. animalis* trovata nelle feci risultava inoltre superiore rispetto a quella ingerita con le dosi somministrate in totale (Mengheri et al., 1999), ad indicare che

il probiotico non solo sopravviveva al transito intestinale, ma era anche in grado di proliferare.

Capacità di adesione alla mucosa intestinale

L'adesione dei microrganismi patogeni alla mucosa intestinale sembra essere cruciale per l'inizio del processo infettivo. Una delle conseguenze dell'adesione dei batteri patogeni all'orletto a spazzola è la lesione di quest'ultimo, che permette quindi l'ingresso dei batteri, la loro proliferazione e la conseguente morte delle cellule epiteliali.

La microflora presente nell'intestino costituisce una barriera contro l'adesione dei batteri patogeni. Sono stati ipotizzati svariati meccanismi per spiegare questa azione difensiva dei probiotici.

Alcuni autori hanno suggerito che la produzione di acidi organici, come l'acido lattico e l'acido acetico, da parte dei probiotici, in special modo da parte di alcuni ceppi di lattobacilli, abbassa il pH intestinale ed inibisce la crescita dei patogeni. Inoltre, gli stessi autori hanno visto che i probiotici stimolano la peristalsi che, indirettamente, rimuove i patogeni accelerandone la velocità di transito nell'intestino (Larioa and Martin, 1990).

Un meccanismo accreditato da vari studi è quello della capacità dei probiotici di competere con i patogeni nell'adesione alla mucosa intestinale. Alcuni probiotici possono infatti inibire l'adesione dei patogeni ai loro siti di legame presenti sulla superficie della membrana intestinale per competizione di legame. L'adesione dei lattobacilli all'epitelio potrebbe avvenire mediante un componente proteico secreto dal batterio, che si lega al recettore della cellula intestinale. Infatti, trattando il

supernatante delle cellule in coltura con tripsina, alcuni autori hanno notato che *L. acidophilus* (ceppo BG2FO4) non era più in grado di aderire sia alla linea di cellule di carcinoma di colon umano (Caco-2), che ad una linea di cellule intestinali secernenti muco (HT29-MTX, Coconnier et al., 1992).

Altri studi effettuati *in vitro* che miravano a verificare la capacità di adesione di quattro ceppi di *L. acidophilus* su linee cellulari hanno messo in evidenza che il ceppo LA1 era in grado di aderire sia alle Caco-2 che alle HT29-MTX. L'adesione era mediata da un fattore proteico presente nel mezzo di coltura del batterio. Inoltre, da questi studi emergeva che *L. acidophilus* inibiva efficientemente l'adesione di tre ceppi di *Escherichia coli* diarrogenici (ETEC, EPEC, DAEC) e *Salmonella typhimurium* alle Caco-2 (Bernet et al., 1994).

Studi più recenti (Gopal et al., 2001), hanno confermato che alcuni lattobacilli, quali *L. rhamnosus* DR20, *L. acidophilus* HN017 e *B. lactis* DR10, sono in grado di aderire a linee di cellule intestinali *in vitro* e di diminuire la colonizzazione e l'ingresso dei patogeni all'interno della mucosa intestinale.

Ulteriori studi hanno suggerito l'ipotesi che i probiotici siano in grado di inibire l'adesione di patogeni all'epitelio intestinale mediante la propria capacità di aumentare la produzione delle mucine intestinali MUC-2 e MUC-3. Infatti, l'adesione di EPEC a cellule HT-29 diminuiva se le cellule venivano trattate con *L. plantarum* e *L. rhamnosus* GG, ed il livello di espressione dei geni MUC-2 e MUC-3 aumentava (Mack et al., 1999), suggerendo che l'aumento delle mucine creava un ingombro sterico che impediva ai batteri patogeni di trovare i siti di legame alle cellule epiteliali.

Prevenzione della diarrea e degli stati infiammatori intestinali

E' ben noto che vari ceppi di lattobacilli possono essere usati per prevenire o trattare la diarrea acuta causata da *E. coli*, *Salmonella* o *Shighella*. E' stato ipotizzato che tale effetto sia dovuto alla produzione di batteriocine da parte di diversi ceppi di probiotici utilizzati (Alm, 1983; Merson et al., 1976; Barefoot and Klaenhammer, 1983).

Alcuni autori hanno usato il *L. casei* GG addizionato allo yogurt, per curare la diarrea associata al trattamento da antibiotici. La somministrazione degli antibiotici può portare infatti ad uno squilibrio microbico con netta riduzione della flora intestinale "benefica", principale responsabile della resistenza verso la colonizzazione dei patogeni. I risultati di questo studio ha mostrato che i volontari umani che avevano ricevuto il probiotico insieme all'antibiotico mostravano minor diarrea rispetto agli individui che consumavano solo yogurt pastorizzato come controllo (Siitonen et al., 1990).

E' stato anche dimostrato che la somministrazione di *L. casei* GG blocca gli episodi di diarrea causati da un ceppo di *Clostridium difficile* o da infezione con rotavirus (Gorbach et al., 1987; Kaila et al., 1992; Isolauri et al., 1994). Saavedra et al. (1994) hanno osservato che il trattamento di gravi forme di diarrea da rotavirus, in bambini ricoverati in ospedale, era più efficace quando *L. casei* GG veniva addizionato alla dieta rispetto al trattamento senza somministrazione orale del probiotico. Inoltre, il numero di plasmacellule secernenti immunoglobuline nel gruppo trattato con *L. casei* GG era approssimativamente il doppio rispetto al gruppo di controllo, e si osservava un aumento della risposta anticorpale di IgA sia rotavirus-specifica, che non specifica. Tali effetti benefici erano anche accompagnati da un aumento delle

IgA sieriche (Majamaa et al., 1995) e da una diminuzione della diffusione del virus (Guarino et al., 1997).

L'efficacia nei confronti della diarrea acuta è ben documentata anche con altri ceppi di probiotici, come *L. reuteri*, *L. casei* e *Saccharomyces boulardii* (Huang et al., 2002, Van Niel et al., 2002). La somministrazione di probiotici, come *B. bifidum*, *Streptococcus thermophilus* e *L. rhamnosus*, si è dimostrata molto utile anche come profilassi per prevenire l'insorgenza della diarrea nosocomiale nei bambini (Saavedra et al., 1994; Szajewska et al., 2001).

Alcuni autori hanno mostrato che *L. casei* era in grado di prevenire l'infezione intestinale causata da *S. typhimurium*, mentre *L. acidophilus* non era in grado di proteggere le cellule, e lo yogurt forniva una prevenzione solo parziale. Inoltre vi era una correlazione tra maggior protezione dall'infezione e aumento della concentrazione di IgA secreta, che indicava una stimolazione del sistema immunitario locale (Perdigon et al., 1995).

Ulteriori studi sperimentali hanno dimostrato che alcuni ceppi di lattobacilli possono prevenire o diminuire disordini della permeabilità intestinale. E' stato infatti visto che l'esposizione prolungata a latte vaccino induceva un aumento della permeabilità intestinale in ratti allo svezzamento, che veniva soppressa quando insieme al latte veniva somministrato *L. casei* GG (Isolauri et al., 1993). Recentemente alcuni autori hanno messo in evidenza che un cambiamento nella composizione della flora enterica, causata da colonizzazione con *Klebsiella pneumoniae*, *S. viridans* ed *E. coli*, portava ad un aumento della permeabilità della parete intestinale. Se la colonizzazione avveniva con *L. brevis*, il passaggio di un marcatore dal lume intestinale ai vasi sanguigni era invece ridotto (Garcia-Lafuente

et al., 2001). Questi studi dimostrano che la stabilizzazione e la funzionalità della barriera intestinale può essere migliorata dalla presenza nel lume intestinale di alcuni ceppi di lattobacilli.

L'incidenza del morbo di Crohn, della colite ulcerosa e della paucite (infiammazione nella tasca ileale che viene ricostruita dopo un intervento di colostomia in pazienti con colite ulcerosa), chiamati collettivamente sindrome infiammatoria intestinale (inflammatory bowel disease, IBD), è in continuo aumento nei Paesi industrializzati. I cambiamenti nello stile di vita, inclusa una maggiore igiene e una riduzione nel consumo di cibi contenenti fermenti batterici, possono alterare il giusto equilibrio microbico necessario per lo sviluppo di un corretto sistema immunitario intestinale (Shanahan F., 2004). Ciò può portare alla comparsa di reazioni immunitarie verso la flora batterica intestinale, che si ritengono essere il primo passo che conduce allo sviluppo delle IBD e di altri disordini legati ad una errata risposta immunitaria. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono infatti che sia il morbo di Crohn che la colite ulcerosa sono causati da un'iperattivazione del sistema immunitario intestinale nei confronti della flora enterica, cui segue l'instaurarsi di uno stato infiammatorio cronico e conseguente danno alla mucosa (Macpherson et al., 1996; Shanahan, 2002). L'equilibrio tra batteri patogeni e benefici a livello intestinale rappresenta invece una protezione contro risposte immunitarie anomale che conducono all'infiammazione. Per questo motivo è stata suggerita, come una buona strategia terapeutica contro le IBD, una modificazione della microflora a favore dei probiotici (Fedorak and Madsen, 2004). Studi sperimentali condotti *ex vivo* su mucose intestinali di pazienti affetti da morbo di Crohn hanno mostrato che alcuni ceppi di lattobacilli, tra cui *L. casei*, possono

indurre una diminuzione del rilascio di TNF- α da parte della mucosa infiammata. Inoltre tale segnale anti-infiammatorio viene trasferito dall'epitelio al tessuto sottostante, con conseguente riduzione dell'espressione dei marcatori di attivazione espressi sui linfociti T della lamina propria (Borrueel *et al.*, 2002). Studi effettuati su bambini affetti da morbo di Crohn, cui è stato somministrato *L. rhamnosus* GG per 10 giorni, hanno rivelato un aumento di cellule secernenti IgA verso β -lattoglobulina e caseina (Malin *et al.*, 1996). Per la colite ulcerosa, sono stati effettuati dei saggi clinici con una preparazione di un *E. coli* non patogeno (ceppo Nissle 1917), ed è stato osservato lo stesso effetto benefico nella remissione della malattia sia con questo probiotico che con il trattamento standard con mesalazina (Kruis *et al.*, 1997; Rembacken *et al.*, 1999). Anche una miscela commerciale di otto diversi ceppi di probiotici, VSL#3, si è dimostrata una valida terapia di mantenimento per la cura della colite ulcerosa (Venturi *et al.*, 1999).

Numerosi studi hanno mostrato interessanti effetti dei probiotici nelle infiammazioni intestinali indotte sperimentalmente in animali per mimare le IBD umane. Fabia *et al.* (1993) hanno notato infatti una diminuzione della colite indotta da acido acetico in ratti trattati con *L. reuteri* R2LC somministrato intracolonicamente. Lo stesso lattobacillo veniva testato da Mao *et al.* (1996), insieme al *L. plantarum* (ceppo DSM 9843), su ratti con enterocolite indotta da trattamento con metotrexato. Essi hanno rilevato una minor permeabilità intestinale, una minor traslocazione batterica ed una minor concentrazione di endotossine nel plasma nei ratti trattati con probiotici rispetto ai ratti non trattati.

Esperimenti condotti su topi IL-10^{-/-} che sviluppano spontaneamente la colite, hanno mostrato che la somministrazione orale di *L. reuteri* o di *L. plantarum* 299V

faceva diminuire significativamente i sintomi della malattia (Madsen et al., 1999; Schultz et al., 2002). Steidler et al. (2000) hanno osservato che somministrando a topi *knockout* per la IL-10 il probiotico *L. lactis* geneticamente modificato per secernere questa citochina, si preveniva l'insorgenza della colite. Altri autori hanno evidenziato che la somministrazione della miscela di probiotici VSL#3 a topi cui era stata indotta la colite con acido trinitrobenzensulfonico, portava ad un aumento della produzione di IL-10 e ad un incremento nel numero delle cellule T_{reg} (Di Giacinto et al., 2005). In altri studi condotti su topi *knockout* per la IL-10 fu invece osservato che vari ceppi di probiotici in grado di alleviare i sintomi della colite inducevano una diminuzione delle citochine IFN- γ and TNF- α ed un aumento di TGF- β (McCarthy et al., 2003).

Nel complesso, questi risultati mostrano che i probiotici agiscono modulando la risposta immunitaria nelle IBD grazie alle citochine regolatorie IL-10 e TGF- β , e suggeriscono un ruolo importante per tali batteri per la cura delle IBD.

Stimolazione del sistema immunitario

Tra i diversi effetti benefici esercitati dai probiotici molto importante è la loro capacità di interazione con il sistema immunitario (Salminen et al. 1998).

Vi sono numerose evidenze che suggeriscono un'azione stimolante dei batteri acido lattici sulla risposta immunitaria sia innata che acquisita, sulla funzione linfocitaria, sulla produzione di anticorpi e della citochine (Gill et al. 2000, Perdigon et al. 1999, Pessi et al. 2000).

E' stato visto che alcuni ceppi di probiotici sono in grado di aumentare il numero di popolazioni di neutrofili e macrofagi, così come di stimolare l'attività delle cellule

natural killer (NK; Gill et al. 2000, Matsuzaki and Chin 2000). La capacità dei probiotici di modulare le popolazioni linfocitarie è stata dimostrata da alcuni autori che osservarono un aumento della popolazione dei linfociti Th in topi alimentati con *L. casei* (Perdigon et al. 1999).

Effetto sulla produzione di anticorpi

Numerosi studi hanno evidenziato che il trattamento con alcuni ceppi di probiotici è in grado di potenziare la risposta immunitaria antigene-specifica nei confronti di infezioni naturali e immunizzazioni. L'effetto si esplica essenzialmente sulla produzione di IgA a livello delle mucose.

Già nel 1992 Perdigon et al. hanno dimostrato che *L. acidophilus*, *L. casei* e lo yogurt favoriscono l'aumento delle cellule secernenti IgA e che tale aumento è proporzionale al numero di dosi somministrate. Gli stessi autori hanno proseguito le ricerche su dei topi alimentati con yogurt e differenti lattobacilli e hanno dimostrato che solo *L. casei* ed *L. plantarum* erano in grado di aumentare il numero dei linfociti CD4⁺ nella lamina propria intestinale, mentre tutti i probiotici somministrati causavano un aumento delle cellule B IgA⁺ nell'intestino (Perdigon et al., 1999). Altri esperimenti condotti su topi cui veniva somministrata oralmente la tossina del colera, hanno mostrato che la produzione sia nell'intestino che nel siero delle IgA specifiche contro tale tossina aumentava notevolmente in seguito a somministrazione di yogurt contenente, oltre ai batteri convenzionali *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, anche *L. acidophilus*, *B. bifidum* e *B. infantis* (Tejada-Simon et al., 1999). Questi risultati dimostravano la capacità di alcuni probiotici a stimolare la risposta immunitaria specifica.

L'aumento della produzione di immunoglobuline da parte dei probiotici è stato osservato anche nell'uomo. Alcuni autori (Link-Amster et al., 1994) hanno somministrato un ceppo attenuato di *S. typhimurium* ad un gruppo di volontari che stavano ricevendo prodotti di latte fermentato contenenti *L. acidophilus* La1 e bifidobatteri. Essi hanno osservato che la produzione di IgA nel siero di quei soggetti era maggiore rispetto a quella dei soggetti di controllo che non ricevevano i probiotici. Dal momento che il meccanismo di protezione contro *Salmonella* è noto essere dipendente dalle IgA (Tagliabue et al., 1986), gli autori hanno potuto concludere che alcuni probiotici possono agire come adiuvanti nell'induzione della risposta immunitaria umorale. Studi clinici sono stati effettuati anche da Kaila et al. (1992), i quali hanno osservato un aumento nella risposta delle cellule secernenti anticorpi IgA circolanti in neonati supplementati con un ceppo di *L. casei*.

Effetti sulla secrezione delle citochine

Per molti anni la produzione di citochine è stata associata solo alla risposta contro le infezioni ed è stata data poca attenzione al fatto che, oltre a vari tipi di alimenti, i batteri lattici potessero indurre la produzione di citochine anche in condizioni di perfetta salute (Bendtzen, 1988). L'effetto maggiormente studiato e documentato sull'attività immunomodulatoria dei probiotici riguarda proprio l'espressione delle citochine, sia pro- che anti-infiammatorie, a livello sia intestinale che sistemico. Tuttavia, i risultati al riguardo sono piuttosto discordanti e le modalità con le quali i probiotici modulano l'espressione delle citochine non sono ancora del tutto chiare.

Numerosi studi condotti *in vitro* riportano un aumento delle citochine pro-infiammatorie quali IL-12 e TNF- α in presenza di probiotici (Hessle et al., 1999; Kato et al., 1999; Miettinen et al., 1998). Hessle et al., (2000) studiando la risposta

di IL-12 e di IL-10 in cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) umane, dopo stimolazione con *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, isolati dalla mucosa intestinale umana, e con *E. coli*, hanno visto che tutti e tre i lattobacilli usati portavano ad un aumento della IL-12 nei PBMC rispetto ad *E. coli*, e il più efficace risultava essere *L. paracasei*. Gli autori hanno notato inoltre, un andamento inverso tra la produzione di IL-12 e quella di IL-10, tranne che nel caso di stimolazione con *L. plantarum*. Altri autori confermarono la tendenza dei lattobacilli ad aumentare la produzione delle citochine infiammatorie, trovando un incremento di IFN- γ e di IL-12 in PBMC umani trattati con *L. johnsonii* e *L. sakei*, mentre il livello di IL-10 non sembrava aumentare (Haller et al., 2000). Solis-Pereyra et al. (1997) hanno trovato un aumento dei valori plasmatici di IFN- α ed IFN- β in topi a cui i batteri lattici venivano iniettati. Inoltre, utilizzando un modello *in vitro* di cellule mononucleate di sangue (BMCs) umane coltivate in un mezzo contenente batteri dello yogurt, hanno notato un aumento nella produzione di IL-1 β , TNF- α , IFN- α ed IFN- γ .

L'aumento della risposta immunitaria innata è stato visto anche in vivo in modelli animali (Perdigon et al., 1991; Perdigon et al., 1988) e nell'uomo (Schiffrin et al., 1995; Schiffrin et al., 1997), dopo somministrazione di prodotti di latte fermentato contenenti probiotici. Da queste evidenze, è stato ipotizzato che i batteri acidolattici possono essere usati come adiuvanti non specifici della risposta immunitaria innata, aumentando i meccanismi di difesa precoci come risposta alle infezioni intestinali (Von der Weid et al., 2001).

E' stata anche riportata un'attività dei probiotici nell'indurre l'espressione delle citochine anti-infiammatorie. Uno studio *in vitro* su coculture di cellule intestinali Caco-2 con PBMC, trattate con vari batteri non patogeni, hanno dimostrato che

diversi batteri possono indurre la produzione di differenti citochine (Haller et al., 2000). Dai risultati ottenuti, *L. sakei* sembrava aumentare i livelli di mRNA delle citochine IL-1 β e TNF- α delle Caco-2 solo in presenza delle PBMC, ed il livello di mRNA di IL-10 delle PBMC umane. *L. johnsonii* invece, mostrava una ridotta capacità ad indurre le citochine infiammatorie, mentre induceva un aumento dei livelli di mRNA di TGF- β nelle Caco-2 solo in presenza delle PBMC. Questo studio suggeriva che le cellule epiteliali possono partecipare alla regolazione della risposta immunitaria della mucosa, modulando l'espressione delle citochine e delle chemiochine in seguito a stimolazione da parte dei batteri non patogeni. Questo risultato suggeriva inoltre che il segnale batterico può giungere sulla superficie della mucosa grazie a mediatori solubili prodotti dalle PBMC.

Von der weid et al. (2001) hanno rilevato un aumento sia di IL-12 che di IL-10 in colture di linfociti splenici di topi trattati con *L. paracasei*. Poiché queste due citochine risultano avere ruoli antagonisti nella regolazione delle cellule Th1, gli stessi autori hanno pensato di osservare gli effetti del batterio nel processo di differenziamento delle cellule T CD4⁺ in topi. I risultati hanno mostrato una forte inibizione della attività proliferativa delle cellule T ed una diminuzione dei livelli di citochine specifiche sia della classe Th1 che della classe Th2 (IFN- γ , IL-4 ed IL-5); al contrario, sia la produzione di IL-10 che quella di TGF- β risultava aumentata. Per giustificare l'aumento di queste due citochine antiinfiammatorie non accompagnato da attivazione dei linfociti Th2, gli autori hanno suggerito che alcuni componenti della flora batterica intestinale potessero indurre la formazione del fenotipo cellulare regolatorio Tr1, che è noto produrre alti livelli di IL-10 (Groux et al., 1997).

Effetti benefici sulle allergie alimentari, malattie autoimmuni e tolleranza orale

Le allergie alimentari e quelle che si manifestano sotto forma di dermatite atopica, rinite allergica ed asma, sono disturbi cronici di importanza crescente nei Paesi maggiormente sviluppati, dovute ad una risposta immunitaria non controllata nei confronti di particolari determinanti antigenici ambientali o alimentari. Agli inizi degli anni '80 venne formulata la cosiddetta “hygiene hypothesis”, in base alla quale il grande aumento nell'incidenza di questi disturbi sarebbe dovuto al miglioramento delle condizioni igieniche, che porta ad una minor esposizione a carichi microbici e quindi a patogeni in grado di innescare una risposta immunitaria di tipo Th1, con conseguente spostamento verso una risposta Th2 e iperproduzione di IL-4 e IgE, caratteristica degli individui allergici (Rautava *et al.*, 2004).

Tra le differenti cellule del sistema immunitario coinvolte nel mantenimento di uno stato tollerante, un ruolo essenziale è svolto dalle cellule T_{reg}, come la popolazione di cellule Th3 che producono alti livelli di TGF- β (Chen *et al.* 1994) e la popolazione di cellule Tr1 che è caratterizzata da elevata secrezione di IL-10 (Groux *et al.* 1997). Un livello non ottimale di cellule T_{reg} può portare ad uno spostamento dell'equilibrio immunologico a favore delle popolazioni Th1 o Th2 e condurre quindi allo sviluppo delle IBD o di allergie ed intolleranze, a seconda della predisposizione genetica ed immunologica individuale (Rook and Brunet, 2005).

Considerando gli effetti immuno modulatori ed anti-infiammtori esercitati dai probiotici, è stato suggerito l'utilizzo dei probiotici come nuova strategia per il controllo delle infiammazioni e delle reazioni allergiche, in quanto sono in grado di alterare favorevolmente la microflora dell'ospite e modulare la risposta immunitaria

intestinale. E' infatti noto che una adeguata colonizzazione dell'intestino da parte della flora batterica nei primi anni di vita è responsabile del corretto equilibrio tra le cellule Th1 e quelle Th2, che fornisce una protezione contro l'insorgenza delle allergie (Kalliomaki and Isolauri, 2003; Bischoff and Crowe, 2004).

La microflora intestinale può promuovere processi potenzialmente anti-allergenici, essa infatti può stimolare la produzione di TGF- β ed IL-10, con conseguente induzione delle cellule T_{reg} che favoriscono la tolleranza orale (Christensen et al., 2002 McGuirk and Mills, 2002). È stata infatti osservata una diminuzione della risposta immunitaria di tipo infiammatorio verso gli antigeni alimentari negli individui allergici in seguito a trattamento con probiotici (Pessi et al., 1999; Peltto et al., 1998, Majamaa and Isolauri, 1997). I sintomi della dermatite atopica erano diminuiti significativamente in bambini che ricevevano *Lactobacillus* GG e lo sviluppo della stessa dermatite era ridotto nei neonati, predisposti alla malattia per fattori ereditari, le cui madri ricevevano il probiotico durante la gravidanza e l'allattamento (Majamaa e Isolauri, 1997; Kalliomaki et al. 2001; Kalliomaki et al. 2003). Questi risultati avvalorano così l'ipotesi che alcuni probiotici possono mitigare le infiammazioni intestinali e le reazioni di ipersensibilità in soggetti con allergie alimentari.

In studi successivi Pessi et al. (2000) hanno verificato se la somministrazione orale di *L. rhamnosus* GG potesse indurre la produzione di mediatori immunosoppressivi nei bambini affetti da dermatite atopica. Essi hanno notato una riduzione dei disturbi nei bambini stessi accompagnato dall'aumento di concentrazione di IL-10 nel siero dopo un lungo trattamento (otto settimane) con il probiotico. Gli stessi effetti benefici sono stati osservati per il trattamento della dermatite atopica in

bambini trattati con *L. rhamnosus* e *L. reuteri* (Rosenfeldt et al., 2003). Un nuovo ceppo di *L. paracasei* isolato dal tratto gastrointestinale umano, LP-33, si è rivelato efficace nel diminuire i sintomi della rinite allergica in bambini cui questo ceppo è stato somministrato per trenta giorni insieme a latte fermentato (Wang et al., 2004). Sono stati effettuati studi anche sugli effetti svolti dai probiotici durante lo sviluppo di malattie autoimmuni. Ad esempio, Kato et al. (1998) hanno somministrato *L. casei* ceppo *Shirota* a dei topi durante lo sviluppo della artrite indotta da collagene di tipo II (CIA), ottenendo un'incidenza ed uno sviluppo minore della malattia nei topi trattati con il probiotico rispetto ai controlli. I livelli degli anticorpi IgG2a e IgG2b specifici contro il collagene di tipo II erano minori nei topi alimentati con *L. casei Shirota* rispetto a quelli che non l'avevano ricevuto. Inoltre i topi trattati mostravano una minor produzione di IFN- γ da parte dei linfociti splenici. Questi risultati hanno mostrato che la somministrazione orale di *L. casei* ceppo *Shirota* era in grado di modificare la risposta immunitaria, sia cellulare che umorale, verso il collagene di tipo II e queste modificazioni potevano portare ad una riduzione dello sviluppo della CIA nei topi.

Lo stesso lattobacillo è stato utilizzato da Matsuzaki et al. (1998) per studiare la produzione di IgE in risposta all'OVA in topi sottoposti ad un processo di immunizzazione. Somministrando *L. casei* ceppo *Shirota* a topi, precedentemente immunizzati con l'antigene OVA, il livello di IgE risultava diminuire rispetto ai controlli sia nel siero, sia nei linfociti splenici ristimolati *in vitro* con OVA. Inoltre, gli stessi autori hanno notato un aumento di produzione di citochine proinfiammatorie, quali IFN- γ , IL-2 e IL-12 ed una diminuzione di quelle

antinfiammatorie, quali IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 da parte dei linfociti splenici dei topi trattati con il probiotico e ristimolati *in vitro* con OVA, rispetto ai controlli.

Alcuni studi sono stati effettuati anche per valutare l'effetto dei probiotici sulla tolleranza orale. Sudo et al. (1997) hanno confrontato la produzione di anticorpi tra topi germfree (GF) e topi cui veniva ristabilita la flora enterica. Essi hanno applicato un protocollo di tollerizzazione per l'OVA e hanno notato che nei topi GF era prodotta un'elevata quantità di anticorpi IgE ed IgG1 specifici per l'OVA. Ristabilendo la flora batterica normale in topi GF appena nati, mediante somministrazione orale di *B. infantis*, che è il principale componente della flora intestinale dei topi, si è osservata una diminuzione degli anticorpi IgE ed IgG1 specifici per OVA rispetto ai topi GF. Nel caso in cui il probiotico veniva somministrato a topi adulti, i livelli di anticorpi specifici per OVA rimanevano elevati. Questi risultati hanno suggerito che le risposte anticorpali anomale nei topi GF dopo l'induzione della tolleranza orale, erano dovute alla mancanza della microflora intestinale, e che una risposta normale poteva essere ristabilita ricostituendo la flora batterica nei topi solo nei primi giorni di vita. Complessivamente questi dati contribuiscono a rafforzare l'ipotesi che alcuni probiotici possono evitare lo sviluppo di immunopatologie dirette verso antigeni presenti nell'ambiente intestinale causate da una rottura della tolleranza orale e ridurre reazioni di tipo allergico ed autoimmune, mantenendo la giusta composizione della flora intestinale.

Miglioramento dell'intolleranza al lattosio

La difficoltà ad assorbire e digerire il lattosio è un disturbo molto frequente che avviene quando la concentrazione dell'enzima β -galattosidasi nell'orletto a spazzola della mucosa dell'intestino tenue è troppo bassa. E' ormai opinione comune che prodotti di latte fermentato, come ad esempio lo yogurt, siano in grado di migliorare la digestione del lattosio in soggetti che soffrono di difficoltà nell'assorbimento e che contribuiscano alla miglior tolleranza del lattosio da parte dei soggetti intolleranti. La principale ragione alla quale si possono attribuire questi effetti è che la β -galattosidasi batterica contenuta nei prodotti a base di latte fermentato sopravvive al passaggio gastrico e, ad opera dei sali biliari, viene liberata nell'intestino tenue, dove interviene in supporto alla carenza endogena.

De Vrese et al. (2001) hanno somministrato prodotti di latte fermentato contenenti *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a dei maiali allo svezzamento. Al fine di valutare se la vitalità dei batteri fosse un requisito fondamentale per l'attività della β -galattosidasi batterica, gli stessi hanno usato lattobacilli vitali, lattobacilli uccisi mediante irradiazione γ , che preserva l'integrità della parete cellulare, oppure lattobacilli uccisi in seguito ad un lungo tempo di conservazione a + 4°C, che porta ad una parziale rottura della parete cellulare. Come controllo è stato somministrato un prodotto pastorizzato privo di β -galattosidasi batterica. Analizzando i picchi di concentrazione di galattosio postprandiale nel plasma, i valori sono risultati uguali sia nel caso del trattamento con lattobacilli vivi che con quelli uccisi mediante irradiazione, e nettamente superiori rispetto ai valori di controllo. Il trattamento con lattobacilli che avevano parziale rottura della parete cellulare dava valori simili ai

controlli. Questi risultati indicavano che l'integrità della parete è un elemento necessario per proteggere l'enzima durante il passaggio gastrico.

Alcuni autori (Mc Donough et al., 1987) hanno riportato tuttavia risultati contrastanti a quanto detto. Infatti la somministrazione di alcuni ceppi di *L. acidophilus* resistenti ai sali biliari, miglioravano di poco la digestione del lattosio e non erano in grado di rilasciare la β -galattosidasi nell'intestino tenue. Sonicando i prodotti contenenti tali lattobacilli, e quindi destabilizzando la parete, gli stessi autori hanno ottenuto un miglioramento nella digestione del lattosio. Questo risultato ha suggerito quindi la necessità della rottura della parete per rilasciare la β -galattosidasi nell'intestino.

Prevenzione dell'ipercolesterolemia

Gia da molto tempo è stata attribuita ai bifidobatteri e ad altri probiotici la capacità di diminuire la concentrazione di colesterolo nel sangue, così come quella di deconiugare e fermentare gli acidi biliari (de Roos & Katan, 2000).

Infatti, Gilliland et al. (1977), hanno notato che *L. acidophilus* è in grado di deconiugare gli acidi biliari in acidi liberi, che sono escreti dal tratto intestinale più velocemente rispetto a quelli coniugati. Ciò porta a nuova sintesi di acidi biliari a partire dal colesterolo, causando una riduzione della concentrazione di colesterolo nel plasma. Inoltre, gli acidi grassi a catena corta, prodotti finali della fermentazione dei carboidrati nell'intestino da parte dei probiotici, inibiscono la sintesi del colesterolo da parte del fegato e portano ad una redistribuzione del colesterolo tra il fegato e il plasma. Altri possibili meccanismi sono l'assimilazione del colesterolo

da parte dei probiotici e il legame di questa molecola alle pareti batteriche (Lavegrove *et al.*, 2003).

Altri studi, condotti sia sull'uomo che su modelli animali, hanno mostrato un effetto da parte di alcuni probiotici anche nell'aumentare il colesterolo-HDL (Taranto *et al.*, 2000; Kiessling *et al.*, 2002).

Prevenzione del cancro

Lo sviluppo del cancro al colon è una delle più importanti cause di mortalità nei paesi industrializzati. E' ormai noto che la flora intestinale può influenzare la carcinogenesi, in quanto alcune specie di batteri che la costituiscono producono degli enzimi, quali glicosidasi, β -glucuronidasi, azotoreduttasi e nitroreduttasi, che trasformano i precarcinogeni in carcinogeni attivi, come le ammine aromatiche eterocicliche (Knasmuller *et al.*, 2001).

Diversi studi condotti su animali hanno mostrato che alcuni probiotici, come *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., possono proteggere da tale attività pro-carcinogenica attraverso vari meccanismi: inibizione della crescita dei batteri pro-carcinogenici, diminuzione dell'attività enzimatica pro-carcinogenica, legame e/o disattivazione di tali composti mutageni, carcinogeni, co-carcinogeni e pro-carcinogeni, produzione di sostanze ad azione antimutagena, riduzione dell'assorbimento intestinale dei composti mutageni, stimolazione della risposta immunitaria (Rolfe, 2000; Goossens *et al.*, 2003).

E' stato visto che *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. sono in grado di ridurre i livelli di β -glucuronidasi, azotoreduttasi, nitroreduttasi ed ureasi, enzimi

responsabili di catalizzare la formazione di amine cancerogene (Goldin et al., 1984; Lidbeck et al., 1991).

Diversi studi condotti su animali hanno mostrato che la supplementazione con ceppi specifici di probiotici può prevenire l'insorgenza, la crescita e la metastasi di tumori indotti dal trattamento con cancerogeni chimici. E' stata altresì evidenziata una diminuzione di alcuni marcatori tumorali specifici (Rafter, 2003; Saikali *et al.*, 2004). Perdigon et al. (1995) hanno studiato l'effetto della somministrazione di yogurt in casi di tumore intestinale indotto chimicamente in topi. I risultati hanno mostrato che la somministrazione di yogurt per un lungo periodo inibiva lo sviluppo del carcinoma intestinale.

Nell'uomo è stata osservata una diminuzione del livello degli enzimi pro-carcinogenici in seguito ad assunzione di alcuni ceppi di *Lactobacillus*, ma resta ancora da stabilire se questo effetto porti ad un'effettiva diminuzione del rischio di cancro al colon (Ling *et al.*, 1994). Malgrado dunque vi siano i presupposti per considerare i probiotici potenzialmente utili nella prevenzione delle patologie neoplastiche, sull'uomo non esistono ancora evidenze sperimentali dirette.

I dati sperimentali ottenuti finora sono comunque supportati da vari studi epidemiologici, che hanno mostrato una diminuzione dell'incidenza del cancro al colon in popolazioni che consumano regolarmente un'elevata quantità di yogurt ed altri prodotti fermentati (Peters et al., 1992; Kampman, 1994).

2. SCOPO DEL LAVORO

La mucosa intestinale è un'enorme superficie esposta continuamente ad un elevato numero di antigeni che giungono nel lume. Il sistema immunitario dell'intestino deve quindi essere in grado di proteggere la mucosa contro i patogeni, ma anche di evitare reazioni di ipersensibilità verso le proteine alimentari, la normale flora batterica ed altre macromolecole presenti nell'ambiente intestinale. E' infatti noto che le reazioni contro gli alimenti hanno una base immunologica e possono derivare da una rottura della tolleranza verso i componenti della flora intestinale o verso alcuni antigeni contenuti negli alimenti stessi. Questo può portare allo sviluppo di risposte immunitarie della mucosa dirette contro gli autoantigeni e quindi alla comparsa di malattie autoimmuni. Tuttavia queste situazioni non sono molto frequenti, grazie alla capacità del sistema immunitario intestinale di discriminare gli antigeni alimentari da quelli di importanza immunologica tramite il processo di tolleranza orale.

Negli ultimi anni, le manifestazioni di allergie alimentari, disturbi atopici e malattie autoimmuni sono in continuo aumento nelle società occidentali. Come già detto nell'introduzione, secondo la "hygiene hypothesis" il grande aumento nell'insorgenza di tali disturbi non sembra essere attribuito esclusivamente a fattori genetici, ma sarebbe dovuto al miglioramento delle condizioni igieniche, che porta ad una minor esposizione a batteri con ridotta stimolazione del sistema immunitario.

In particolare è stato recentemente visto che tra i batteri della flora intestinale sono i probiotici ad essere responsabili della formazione di una corretta risposta immunitaria, mantenendo un giusto equilibrio nella microflora, esercitando

protezione contro patogeni intestinali e modulando la risposta immunitaria. Infatti il trattamento con probiotici sembra portare ad un miglioramento nelle allergie alimentari, disturbi autoimmuni e tolleranza orale (Isolauro, 2001; Dugas, 1999).

Fin'ora i disturbi e le malattie sopra nominati sono stati controllati eliminando dalla dieta l'antigene responsabile della risposta immunitaria, ma sta acquisendo notevole importanza l'utilizzo di alimenti funzionali contenenti probiotici per mantenere la salute dell'individuo e prevenire o migliorare alcune patologie immunitarie.

Tuttavia, restano ancora da chiarire i meccanismi mediante i quali i probiotici modulano la risposta immunitaria intestinale.

In questo studio si è voluto verificare se la somministrazione orale di probiotici potesse indurre una risposta anti-infiammatoria e tollerogena a livello intestinale ed i meccanismi che ne stanno alla base.

A questo scopo sono stati utilizzati due modelli sperimentali: ratti resi tolleranti verso l'antigene alimentare OVA, normalmente non presente nella loro dieta, mediante somministrazione orale di tale antigene e successiva immunizzazione, e ratti solo immunizzati con lo stesso antigene. I probiotici utilizzati sono stati:

- *Bifidobacterium animalis* MB5, un ceppo relativamente nuovo, ma già utilizzato nel nostro laboratorio in studi condotti in ratti resi carenti in zinco, in cui si dimostrava capace di proteggere la mucosa intestinale dai danni morfologici e infiammatori causati da tale carenza (Mengheri et al., 1999);

- *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* GG, un probiotico di cui sono ben note dalla letteratura molte attività benefiche e già disponibile in commercio.

3. MATERIALI E METODI

Animali

I ratti utilizzati in tali studi provenivano dal ceppo Sprague-Dawley (Charles River, Como), sono stati allevati in gabbie di acciaio inossidabile, in stanze a temperatura controllata stazionaria a 23°C, in condizione alternata di luce e buio di 12 ore.

Preparazione dei batteri

I batteri venivano cresciuti nel proprio mezzo di coltura DeMan Rogosa Sharp (MRS, Difco) in anaerobiosi in un incubatore con temperatura costante di 37°C. Quotidianamente veniva controllata la densità ottica mediante lettura a 600 nm con uno spettrofotometro (modello DU.40, Beckman, Milano) e determinata la concentrazione. La quantità di batteri desiderata veniva prelevata in fase di crescita esponenziale e, dopo centrifugazione a 3000 rpm (centrifuga Beckman, modello TJ-6) per 5 minuti, veniva risospesa in phosphate buffered saline (PBS, Euroclone).

Trattamento sperimentale degli animali

Tutti i ratti venivano alimentati con una dieta standard fornita dalla ditta Mucedola (Settimo Milanese), ed avevano libero accesso al cibo e ad acqua distillata e deionizzata.

Al raggiungimento del peso di circa 150-160 g., i ratti venivano divisi in tre gruppi: il gruppo Ba riceveva oralmente, tutti i giorni, una quantità fissa (8×10^8 batteri per ratto) di *Bifidobacterium animalis*, ceppo MB5 (ATCC 25527), isolato e fornito da B. Biavati (1995) in fase di crescita esponenziale per quattro settimane; il gruppo

LGG riceveva *Lactobacillus casei* subsp. *rharmnosus* ceppo GG (ATCC 53103) nelle stesse dosi e modalità dell'altro probiotico; il gruppo C riceveva PBS invece dei batteri.

Dopo una settimana dall'inizio del trattamento con i probiotici, i ratti dei tre gruppi venivano suddivisi in due sottogruppi ciascuno, in base a due diversi protocolli sperimentali: tollerizzazione ed immunizzazione, come riportato nello schema allegato (Fig.7). All'inizio della seconda settimana, ai ratti cui doveva essere indotta la tolleranza (C-t, Ba-t, LGG-t), veniva somministrata oralmente una bassa dose di ovalbumina (OVA, 7 mg; Sigma, Milano) sciolta in PBS, per tre volte nella settimana, mentre ai ratti che dovevano essere solo immunizzati (C-i, Ba-i, LGG-i) veniva somministrato oralmente solo il PBS. Giunti alla terza settimana, tutti i ratti venivano immunizzati tramite un'iniezione sottocutanea di 300 µg di OVA, emulsionata in adiuvante di Freund completo (CFA, Sigma). L'emulsione veniva preparata miscelando 300 µl di una soluzione di OVA (1mg/ml) in PBS sterile con 300 µl di CFA e sonicando il tutto mediante un sonicatore ad immersione (Sonics & Materials, Tecnochimica Moderna, Roma). La settimana successiva veniva effettuato un richiamo a tutti i ratti ripetendo la stessa iniezione nelle stesse dosi. Alla quinta settimana i ratti venivano sacrificati dopo essere stati anestetizzati con un'iniezione intraperitoneale di Farmotal (6 mg/Kg di peso corporeo; Pharmacia & Upjohn, Milano).

Dagli animali venivano rimossi, in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare (C.A.M.Bio, modello Aura Mini), milza e linfonodi mesenterici che venivano subito posti in PBS addizionato di antibiotici (100 µg/ml streptomina, 10U/ml ampicillina, Euroclone).

MODELLI E PROTOCOLLI SPERIMENTALI

Ratti alimentati con dieta standard fino a un peso di 150 g. Sud divisi in 3 gruppi: 2 trattati oralmente con probiotici (8×10^8 batteri/giorno) per 4 settimane e 1 non trattato di controllo

L. casei (LGG)

B. animalis (Ba)

Controllo (C)

2^a settimana:

All'inizio della 2^a settimana, ognuno dei 3 gruppi veniva suddiviso in due sottogruppi di ratti tolleranti (LGGt, Bat, Ct) e immunizzati (LGGi, Bai, Ci), in base ai seguenti protocolli sperimentali:

Induzione della tolleranza orale
Somministrazione orale per 3 volte di ovalbumina (OVA, 7 mg):
Ratti tolleranti: LGGt, Bat, Ct

Immunizzazione
Somministrazione orale per 3 volte di PBS:
Ratti immunizzati: LGGi, Bai, Ci

3^a settimana:

Prima iniezione di 300 µg di OVA in complete Freund's adjuvant (CFA)

4^a settimana:

Seconda iniezione di 300 µg di OVA in CFA

5^a settimana:

Prelievo di milza e linfonodi mesenterici

Fig.7: Modelli e protocolli sperimentali

Saggio della risposta di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH)

Dopo 6 giorni dall'ultimo richiamo dell'iniezione di OVA, ad alcuni ratti di ciascun sottogruppo venivano iniettati 25 µg di OVA in 50 µl di PBS sotto la pianta del piede della zampa sinistra e 50 µl di PBS sotto quella del piede della zampa destra. Dopo 24 ore il gonfiore sviluppato veniva misurato con un calibro digitale.

Preparazione dei linfociti

In condizioni di sterilità (cappa a flusso laminare Gelaire, modello BSB-3), i linfociti splenici venivano estratti dalla milza mediante perfusione del mezzo di coltura direttamente nell'organo tramite siringhe da insulina. L'aumento di pressione ottenuto all'interno della milza faceva fuoriuscire i linfociti insieme al mezzo stesso. I linfonodi mesenterici venivano grattati su delle retine di ottone sterili, quindi i linfociti venivano raccolti e filtrati su del cotone sterile per eliminare i residui di tessuto.

Una parte delle cellule venivano sedimentate in una centrifuga (Beckman, modello TJ-6) a 1200 rpm, a temperatura ambiente per 5 minuti e poi risospese nel mezzo di coltura RPMI- 1640, (Biochrom AG), contenente 100 µg/ml streptomicina, 10 U/ml ampicillina, 2 mM glutammina, 10% siero bovino fetale inattivato (30 minuti a 56°C), 1% di una soluzione di aminoacidi non essenziali 100X, 50 µM di β-mercaptoetanololo. I prodotti usati per le colture erano forniti dalla ditta Euroclone.

I linfociti venivano contati al microscopio ottico mediante una camera di Neuhauser per la conta cellulare e piastrati per testarne la proliferazione, l'espressione genica e la secrezione delle citochine, secondo i protocolli sperimentali di seguito riportati.

Tutte le cellule venivano poste in incubatore (Steri-Cult 200, Forma Scientific) a 37°C, con il 5% di CO₂ e il 95% di umidità.

Una parte dei linfociti mesenterici veniva separata mediante gradiente di Ficoll-Plaque (Amersham Bioscience, Milano). Questo polimero ha una densità intermedia tra quella degli eritrociti e quella dei PBMC e grazie al principio della centrifugazione a gradiente, permette di separare i linfociti, che si stratificano sottoforma di un anello biancastro all'interfaccia delle 2 fasi (Ficoll-sospensione cellulare), e gli eritrociti che hanno una densità maggiore e sedimentano costituendo il pellet. La sospensione di 10 ml veniva fatta colare dalla parete del tubo posizionato quasi orizzontalmente, sopra il Ficoll. Una volta create le 2 fasi, queste venivano centrifugate a 1800 rpm per 40 minuti a temperatura ambiente in una centrifuga senza freno (Beckman, modello TJ-6). Gli anelli di linfociti venivano raccolti all'interfaccia delle 2 fasi mediante una pipetta pasteur, messi in un nuovo tubo e lavati in 15 ml di PBS per allontanare il Ficoll residuo. Dopo centrifugazione a 1200 rpm per 5 minuti, i linfociti totali sono stati risospesi in PBS e contati al microscopio ottico, per calcolarne la concentrazione.

Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie

L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie veniva effettuata mediante citofluorimetria a flusso, una metodica che permette di valutare parametri fisici e chimici di particelle biologiche o cellule contenute in una sospensione e di identificare sottopopolazioni di cellule sulla cui membrana è presente una struttura riconosciuta da un anticorpo monoclonale specifico coniugato con un marcatore fluorescente.

Dopo la separazione su gradiente di Ficoll, i linfociti mesenterici (1×10^7 cells/ml) venivano preparati per l'analisi delle sottopopolazioni. Le cellule venivano lavate in PBS e fissate con paraformaldeide (4%; 10 minuti a 4°C). I linfociti venivano poi incubati per 30 minuti a 4°C con anticorpo anti CD3 di ratto (clone 1F4) coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC), anticorpo anti CD25 di ratto (clone OX-39) o anti CD8 di ratto (clone OX-8) coniugato con ficoeritrina (PE) e anticorpo anti CD4 di ratto (clone OX-35) coniugato con ficoeritrina cianina 5 (PE Cy5). Tutti gli anticorpi usati erano della Pharmingen (Becton Dickinson, Milano), e veniva utilizzato 1 µg di anticorpo ogni 10^6 linfociti. L'analisi delle sottopopolazioni veniva effettuata utilizzando un fluorescence-activated cell sorter (FACS-Calibur, Becton Dickinson, Milano).

Proliferazione linfocitaria in risposta al mitogeno ConA

La capacità proliferativa dei linfociti veniva testata dopo stimolazione con il mitogeno Concanavalina A (Sigma), capace di indurre la proliferazione policlonale delle cellule, quindi di stabilire il grado massimo di risposta proliferativa che le cellule possono raggiungere.

I linfociti venivano posti in coltura alla concentrazione di $1,5 \times 10^6$ cellule/ml in piastre da 96 pozzetti (Costar; SIAL; Roma), in maniera da avere 3×10^5 cellule/pozzetto. I linfociti venivano lasciati per 72 ore in coltura in presenza del mitogeno ConA (2,5 µg/ml). Nelle ultime 18 ore di coltura veniva aggiunto 1 µCi di timidina triziata per ogni pozzetto (attività specifica di 6,7 mCi/mmol; NEN, Germania). Le cellule venivano filtrate mediante un Cell Harvester (Nunc) su appositi filtri di carta (Titertek). Questi venivano fatti asciugare e messi in vials di

scintillazione (Beckman) in presenza di 2 ml di liquido di scintillazione Hisafe2 (Wallace, Milano). La radioattività incorporata veniva quindi determinata mediante uno scintillatore (Beckmann, modello LS1801).

Proliferazione linfocitaria in risposta all'OVA

Uno stesso numero di linfociti (3×10^5 cellule/pozzetto) venivano piastrati in piastre da 96 pozzetti in presenza o meno di OVA alla concentrazione finale di 5 mg/ml e lasciati in coltura per 96 ore. Il tempo e la quantità di OVA erano quelli che davano la massima proliferazione, come determinato da esperimenti preliminari. La timidina triziata veniva aggiunta nelle ultime 18 ore di coltura e le cellule venivano filtrate con la stessa procedura utilizzata per il mitogeno.

Estrazione di RNA dai linfociti

I linfociti necessari per l'estrazione dell'RNA (5×10^7) venivano piastrati su fiasche da 75 cm² (Costar) in presenza o meno di OVA alla concentrazione finale di 5 mg/ml e lasciati in proliferazione per 72 ore. I linfociti venivano infine raccolti, centrifugati a temperatura ambiente per 5 minuti a 1200 rpm (centrifuga Beckman modello TJ-6) e risospesi in 3 ml di tampone GT (guanidina tiocianato 5M; sodio citrato pH 7, 25 mM; sarcosile 0,5%; EDTA pH 7,5, 2 mM; e 5% β -mercaptoetanol aggiunto fresco). Le cellule venivano omogenate tramite una siringa finché l'omogenato non risultava completamente fluido. L'omogenato si stratificava quindi su gradiente di CsCl (4.95M) e 0.1M EDTA, in tubi da ultracentrifuga per rotore SW-40 (Beckman, Milano), e si centrifugava per 17 ore, a 20°C, a 34000 rpm in ultracentrifuga (Beckman, modello L8-70M). Il supernatante

veniva aspirato e, dopo aver tagliato i tubi a circa 1 cm dal fondo, il sedimento contenente l'RNA veniva risospeso in 200 µl di urea 7 M-sarcosile 2%, per eliminare residui di proteine, e raccolto in tubi RNAsi free. Venivano aggiunti a questa soluzione 100 µl di cloroformio, 100 µl di fenolo e dopo agitazione con vortex si centrifugava a 2500 g con una microcentrifuga (Ole Dich) 10 minuti a 4°C, per separare le 2 fasi: organica ed acquosa. La fase acquosa veniva recuperata in un nuovo tubo e veniva aggiunto Na-acetato (1/10 del volume raccolto) e 2,5 volumi di etanolo assoluto. Dopo aver invertito delicatamente i tubi, questi venivano posti almeno 1 ora a -80 °C per far precipitare l'RNA. Dopo centrifugazione a 14000 g, 30 minuti a 4°C, il supernatante veniva scartato e il pellet veniva lavato in etanolo 70%. Infine il pellet veniva essiccato sottovuoto in Speedvac concentrator (SAVANT, Roma), e risospeso in 25 µl di acqua bidistillata ed RNAsi free. La densità ottica veniva determinata mediante lettura allo spettrofotometro (DU.70, Beckmann) a 260 nm e 280 nm per valutare la quantità di RNA (260 nm) e la eventuale presenza di proteine (280 nm). Il rapporto ottimale tra le due densità ottiche (260 nm/280 nm), che assicura un grado elevato di pulizia dell'RNA, dovrebbe dare un valore tra 1,7 e 2. Se il rapporto non risultava ottimale, si procedeva ad una ulteriore estrazione con fenolo/cloroformio. Dopo averne determinato la concentrazione, l'RNA veniva diluito a 1 µg/µl in acqua bidistillata ed autoclavata, e conservato a -80 °C.

Per verificare che i campioni non fossero degradati, un'aliquota pari a 1 µg/µl di RNA veniva corsa su gel denaturante di agarosio secondo il protocollo seguente: l'RNA veniva fatto denaturare a + 80°C in presenza di tre volumi di tampone di carica così costituito: 90 µl di MOPS 10X (acido morfolinpropansulfonico), 450 µl

di formammide (Sigma), 135 µl di formaldeide 37% (Sigma). Il campione veniva raffreddato immediatamente in ghiaccio e quindi fatto correre su un gel all'1,2 % di agarosio in MOPS 1X, 2 % formaldeide e 0,05 µg/ml di bromuro di etidio.

Il bromuro di etidio è in grado di intercalarsi tra le basi dell'RNA e di emettere luce fosforescente se esposto a luce ultravioletta, consentendo così di visualizzarlo. Il gel veniva fatto correre in tampone MOPS 1X a circa 50 V per 1 ora. Al termine della corsa il gel veniva visualizzato mediante un transilluminatore a luce ultravioletta per evidenziare le bande dell'rRNA 28S e 18S.

Trascrittasi inversa e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR)

L'espressione genica delle citochine dei linfociti mesenterici e splenici è stata analizzata mediante la tecnica della RT-PCR che permette, attraverso l'amplificazione del cDNA, di analizzare anche livelli molto bassi di mRNA altrimenti non evidenziabili come nel caso di espressione costitutiva di citochine.

La RT è una reazione in grado di convertire l'RNA in cDNA sfruttando la capacità dell'enzima trascrittasi inversa di trascrivere un filamento di DNA a partire dall'mRNA. Questo nuovo filamento è detto cDNA in quanto è un filamento complementare rispetto a quello di DNA originario dal quale è derivato l'mRNA estratto.

Per ottenere il cDNA veniva utilizzato il protocollo riportato in Tabella 1. La MMLV-RT (Gibco, Milano) è una trascrittasi inversa estratta dal un virus Moloney murine leukemia. L'inibitore della RNasi era fornito dalla ditta Promega, (Firenze).

La miscela ottenuta veniva incubata per un'ora a 37°C, e poi a 95°C per 5 minuti in modo tale da inattivare l'enzima. Il cDNA veniva conservato a -80°C fino al momento dell'uso.

Tabella 1

	Volume	Concentrazione finale
RNA totale	1 µl	1 µg/ µl
Tampone 5x: 250 mM Tris-HCl pH 8.3 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂	4 µl	50 mM 75 mM 3 mM
0.1 M DTT	2 µl	10 mM
2.5 mM dNTPs	4 µl	0.5 mM
50 µM oligo (dT) ₁₆₋₁₈	1 µl	2.5 µM
MMLV-RT	1 µl	200 U/ µl
inibitore di RNasi	1 µl	40 U/ µl
H ₂ O bidistillata	6 µl	
	20 µl totali	

La PCR veniva effettuata per le citochine anti-infiammatorie IL-10, IL-4, TGF-β e per le citochine pro-infiammatorie IFN-γ e cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC), equivalente alla IL-8 umana. Ogni campione di PCR conteneva sia i primers della citochina in esame che quelli della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), che è un gene housekeeping usato come standard interno del livello di espressione genica. La miscela di PCR conteneva alla concentrazione finale: 2,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 300 nM primer senso, 300 nM primer antisenso, 0,2 nM dNTPs, 1 U/25 µl DNA Taq polimerasi (Polymed; Firenze), e 4 µl del prodotto di RT. Il volume finale della miscela di reazione era portato a 25 µl tramite aggiunta di H₂O bidistillata. I primers, già utilizzati in un precedente lavoro svolto nel nostro laboratorio (Finamore et al., 2003), venivano forniti dalla ditta MWG Biotech (Firenze) e le

loro sequenze sono riportate nella Tabella 2. Per la reazione venivano utilizzate provette da PCR a parete sottile. L'incubazione veniva fatta in un termoblocco (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystem, Roma) con tappo di chiusura riscaldato per evitare l'evaporazione dei reagenti.

Il programma di PCR utilizzato per tutte le citochine e per tutti i campioni era il seguente:

step 1) denaturazione: 1 ciclo: 3 minuti a 95°C;

step 2) denaturazione, appaiamento ed estensione: 35 cicli: 30 secondi a 94°C e 2,5 minuti a 62°C;

step 3) estensione: 1 ciclo finale: 10 minuti a 72°C.

Tabella 2

IL-10 (fr = 348 bp)	S : 5'-TGC CTT CAG TCA AGT GAA GAC- 3' A : 5'-AAA CTC ATT CAT GGC CTT GTA-3'
IL-4 (fr = 378 bp)	S : 5'-TGA TGG GTC GTC TCA GCC CCC ACC TTG C- 3' A : 5'-CTT TCA GTG TTG TGA GCG TGG ACT C- 3'
TGF-β (fr = 545 bp)	S : 5'-ACC GCA ACA ACG CAA TCT AT- 3' A : 5'-GCC GTA CAC AGC AGT TCT TCT C- 3'
IFN-γ (fr = 405 bp)	S : 5'-ATG AGT GCT ACA CGC CGC GTC TTG G-3' A : 5'-GAG TTC ATT GAC AGC TTT GTG CTG G-3'
CINC (fr = 241 bp)	S : 5'- ATG GTA TCA GCC ACC CGC TCG-3' A: 5'- GAC ACC CTT TAG CAT CTT TTG- 3'
GAPDH (fr = 702 bp)	S : 5'-GCC ATC AAC GAC CCC TTC AT- 3' A: 5'-CGC CTG CTT CAC CAC CTT CT- 3'

Analisi dei prodotti di PCR

La miscela di amplificazione veniva sottoposta ad una corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% in TAE 1X (Tris-Acetato 40 Mm; EDTA 1 mM), in presenza di 0,2 µg/ml di bromuro di etidio, a 80V per 1 ora. Il gel veniva fotografato sotto luce ultravioletta e le foto venivano acquisite tramite uno scanner Speedy 2000 (Eurocalcolo). La densitometria delle bande relative alle citochine ed allo standard

interno, veniva analizzata mediante un software Scion (Scion Corporation; Frederick MD). La quantità di mRNA delle citochine era determinata come rapporto tra la citochina e la GAPDH.

Saggio ELISA

La quantità di citochine prodotta dai linfociti mesenterici e splenici è stata misurata mediante saggio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) in grado di riconoscere in modo specifico le proteine mediante legame antigene-anticorpo monoclonale. Il complesso è riconosciuto e legato da un anticorpo policlonale marcato con un enzima. Calcolando l'attività enzimatica, dopo aggiunta del substrato, si ha una stima direttamente proporzionale alla quantità di antigene in esame. I supernatanti delle colture cellulari stimolati o meno con OVA (5 mg/ml) per 72 ore, venivano raccolti ed analizzati per determinare i livelli di secrezione della IL-10, mediante un kit fornito dalla ditta Endogen (Tema Ricerca; Bologna).

Analisi statistica

Le differenze dei risultati tra i vari gruppi di ratti venivano analizzate con ANOVA associato al test di Fisher. Le differenze con un valore di $P < 0,05$ erano considerate significative.

4. RISULTATI

Risposta proliferativa all'OVA

I linfociti dei ratti tolleranti (C-t, Ba-t, LGG-t) ed immunizzati (C-i, Ba-i, LGG-i) venivano messi in coltura in presenza o meno di OVA per valutarne la proliferazione. Le figure 8 e 9 mostrano i risultati della proliferazione dei linfociti splenici e mesenterici, misurati come incorporazione di timidina triziata e riportati come indice di stimolazione, ossia come rapporto delle cpm dei linfociti stimolati sulle cpm dei linfociti non stimolati. Nei ratti di controllo tolleranti (C-t) la risposta proliferativa all'OVA risultava più bassa nei linfociti sia mesenterici che splenici rispetto a quella dei ratti di controllo immunizzati (C-i), indicando che con il protocollo sperimentale utilizzato si aveva induzione della tolleranza orale verso l'OVA. La risposta proliferativa dei ratti Ba-t risultava ulteriormente ridotta rispetto a quella dei ratti C-t nei linfociti mesenterici, mentre era simile a quella dei ratti C-t nei linfociti splenici (Fig.8). Nei ratti C-i la proliferazione dei linfociti mesenterici e splenici dopo stimolazione *in vitro* con OVA, risultava molto alta. Il trattamento con i probiotici (ratti Ba-i e LGG-i) portava ad una drastica riduzione della risposta proliferativa all'OVA rispetto a quella dei ratti C-i nei linfociti mesenterici, mentre nei linfociti splenici risultava simile a quella dei ratti C-i (Fig.9).

Risposta proliferativa alla ConA

Per verificare se la ridotta risposta proliferativa dei linfociti mesenterici dei ratti trattati con batteri probiotici fosse solo antigene specifica, mantenendo quindi la

capacità di rispondere ad altri antigeni, la risposta proliferativa linfocitaria veniva analizzata anche dopo stimolazione con il mitogeno policlonale ConA.

I risultati della proliferazione con o senza stimolazione con il mitogeno sono misurati come incorporazione di timidina triziata e riportati come indice di stimolazione nelle figure 10 e 11.

Dai risultati ottenuti, non veniva notata alcuna diminuzione della proliferazione in nessun gruppo dei ratti analizzato, indicando che la diminuzione riscontrata in risposta alla stimolazione con l'OVA era antigene specifica.

Risposta di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH)

Per confermare che l'azione inibitoria sopra descritta, fosse svolta dai probiotici solo a livello intestinale, veniva saggiata la risposta DTH, una reazione infiammatoria locale che raggiunge il massimo 24-48 ore dopo la somministrazione intradermica di un antigene in individui precedentemente sensibilizzati da una immunizzazione con lo stesso antigene.

I risultati, riportati nella figura 12 ed espressi in mm, mostrano che la risposta DTH era quasi assente nei ratti tolleranti, mentre risultava marcata e della stessa entità in tutti i gruppi di ratti immunizzati.

Valutazione dell'espressione delle citochine nei linfociti mesenterici e splenici

Come riportato nell'introduzione, uno dei meccanismi principali per l'induzione della tolleranza orale è la soppressione dei cloni reattivi all'antigene mediata da citochine (Weiner, 1997; Simeka, 1998). Per verificare se le citochine potessero essere coinvolte nella riduzione della proliferazione dei linfociti dei ratti trattati con

probiotici, è stata analizzata, mediante il saggio RT-PCR, l'espressione genica di IL-10, IL-4 e TGF- β , che sono tra le principali citochine coinvolte nell'induzione della tolleranza, e l'espressione di IFN- γ e CINC quali citochine infiammatorie, nei linfociti sia splenici che mesenterici.

Per ogni campione, i valori dell'mRNA della citochina in esame venivano normalizzati per l'mRNA del gene di controllo GAPDH (mRNA citochina/mRNA GAPDH). I risultati sono riportati nelle figure 13-22 ed espressi come rapporto dell'mRNA del campione stimolato con OVA sull'mRNA del campione non-stimolato.

L'analisi dell'espressione genica delle citochine anti-infiammatorie non evidenziava alcuna differenza nei linfociti sia mesenterici che splenici dei ratti tolleranti (Fig. 13, 15, 17). Un significativo aumento di IL-10 veniva riscontrato nei linfociti mesenterici dei ratti LGG-i rispetto a quelli dei ratti C-i, mentre non variava nei linfociti splenici dei tre gruppi di ratti immunizzati (Fig.14). Il livello di TGF- β e di IL-4 dei linfociti mesenterici e splenici non mostrava variazioni nei tre gruppi di ratti immunizzati (Fig.16, 18).

L'espressione delle citochine infiammatorie IFN- γ e CINC non mostrava differenze tra i tre gruppi di ratti tolleranti, nè a livello dei linfociti splenici che mesenterici (Fig.19, 21). Non si notavano differenze di espressione genica per IFN- γ e CINC neanche tra i linfociti mesenterici dei tre gruppi di ratti immunizzati, mentre l'espressione di tali citochine risultava ridotta nei linfociti splenici dei ratti Ba-i e LGG-i rispetto agli C-i (Fig.20, 22).

Saggio ELISA

Per verificare se l'aumento di espressione genica della IL-10 trovato a livello dei linfociti mesenterici dei ratti immunizzati trattati con i probiotici venisse accompagnato da un aumento della sua secrezione, è stata misurata la quantità di proteina rilasciata dai linfociti dei ratti immunizzati in coltura, stimolati o meno con OVA, mediante saggio ELISA.

I risultati sono riportati in figura 23 come quantità di citochina secreta. Il livello di IL-10 prodotto risultava maggiore nei linfociti mesenterici dei ratti LGG-i, rispetto ai ratti C-i nei campioni non stimolati *in vitro* con OVA. I campioni stimolati avevano un livello di secrezione della IL-10 simile nei tre gruppi di ratti.

Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie

Per comprendere se il trattamento con i probiotici potesse indurre cambiamenti a livello delle sottopopolazioni linfocitarie, veniva effettuata l'analisi delle principali classi linfocitarie, le CD4 e le CD8e di quelle implicate nei processi di tolleranza, le CD4-CD25.

I risultati sono riportati nelle figure 24 e 25 ed espressi come percentuale dei linfociti totali identificati dall'espressione del CD3, marker specifico dei linfociti.

La percentuale di linfociti CD4 risultava diminuita nei ratti LGG-i rispetto a quelli C-i, mentre la percentuale di linfociti CD8 non variava nei gruppi di ratti analizzati (Fig. 24). La sottopopolazione di linfociti CD4-CD25 è molto espressa nei ratti tolleranti (C-t) e risultava invece drasticamente ridotta nei ratti immunizzati (C-i) (Fig.25). I ratti immunizzati e trattati con probiotici non risultavano uguali a C-t, ma

superiori a C-i del 30% (Ba-i) e 40% (LGG-i), tuttavia solo il gruppo LGG-i risultava significativamente differente (Fig.25).

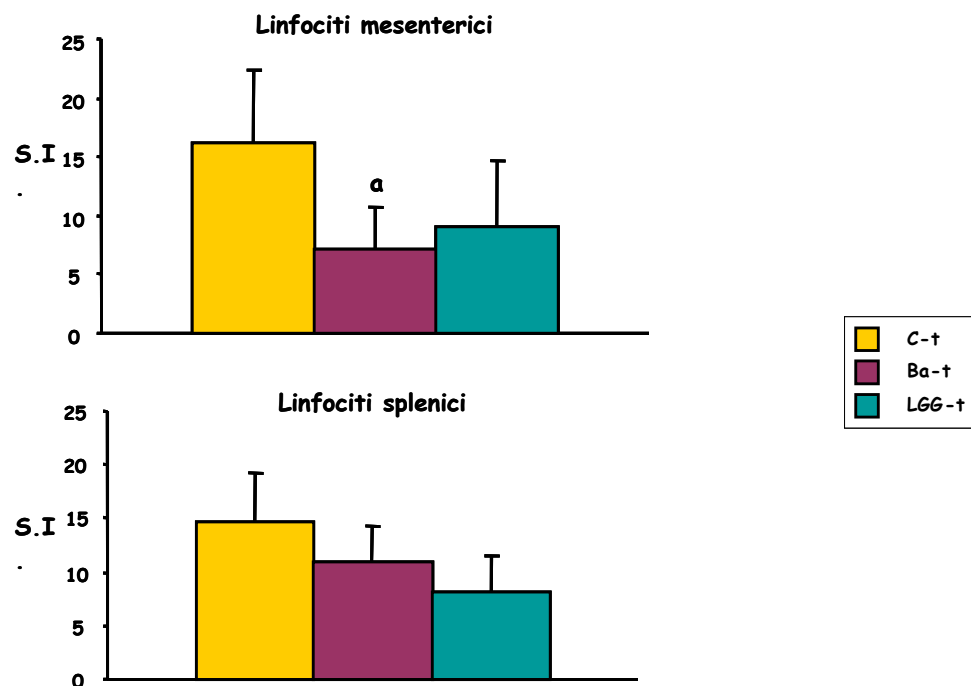


Fig. 8 - Risposta proliferativa all'OVA dei linfociti mesenterici e splenici dei ratti tolleranti.
I linfociti (3×10^5 cellule/pozzetto) dei ratti non trattati (C-t) e trattati con probiotici (Ba-t e LGG-t), venivano messi in coltura con e senza aggiunta di 5 mg/ml di OVA, per 96 ore. La proliferazione cellulare veniva misurata come incorporazione di ^3H -timidina aggiunta nelle ultime 18 ore. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 20 animali. (a: Ba-t vs Ct $P < 0,01$).

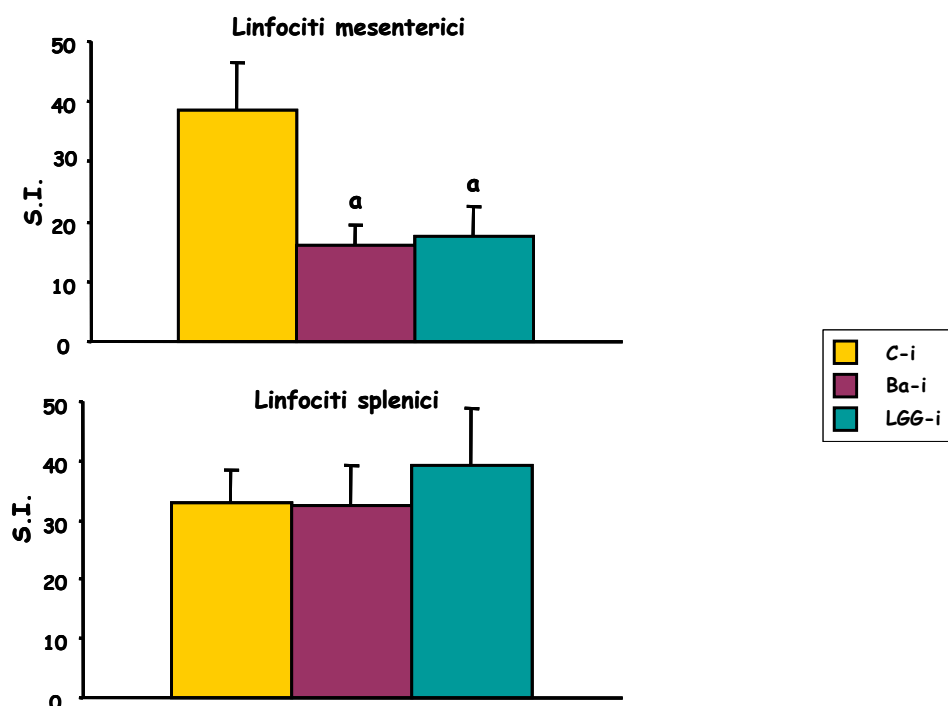


Fig. 9 - Risposta proliferativa all'OVA dei linfociti mesenterici e splenici dei ratti immunizzati.
I linfociti (3×10^5 cellule/pozzetto) dei ratti non trattati (C-i) e trattati con probiotici (Ba-i e LGG-i), venivano messi in coltura con e senza aggiunta di 5 mg/ml di OVA, per 96 ore. La proliferazione cellulare veniva misurata come incorporazione di ^3H -timidina aggiunta nelle ultime 18 ore. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 20 animali. (a: Ba-i e LGG-i vs C-i $P < 0,01$).

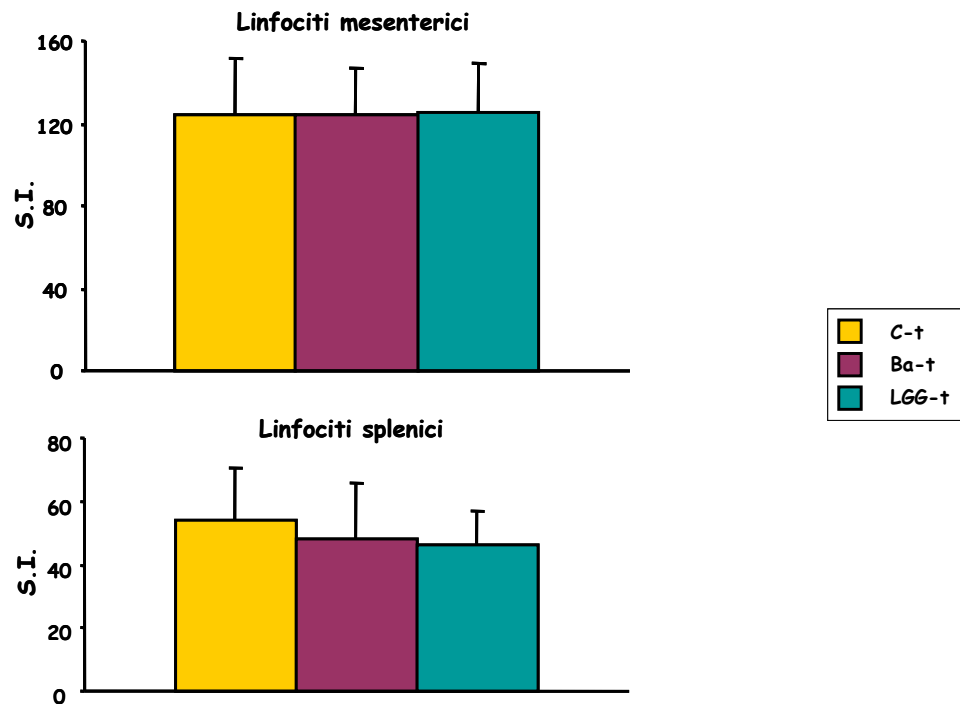


Fig. 10 - Risposta proliferativa alla ConA dei linfociti mesenterici e splenici dei ratti tolleranti.
 I linfociti (3×10^5 cellule/pozzetto) dei ratti non trattati (C-t) e trattati con probiotici (Ba-t e LGG-t), venivano messi in coltura in presenza o meno di 2,5 mg/ml di ConA, per 72 ore. La proliferazione cellulare veniva misurata come incorporazione di ^3H -timidina aggiunta nelle ultime 18 ore. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 20 animali.

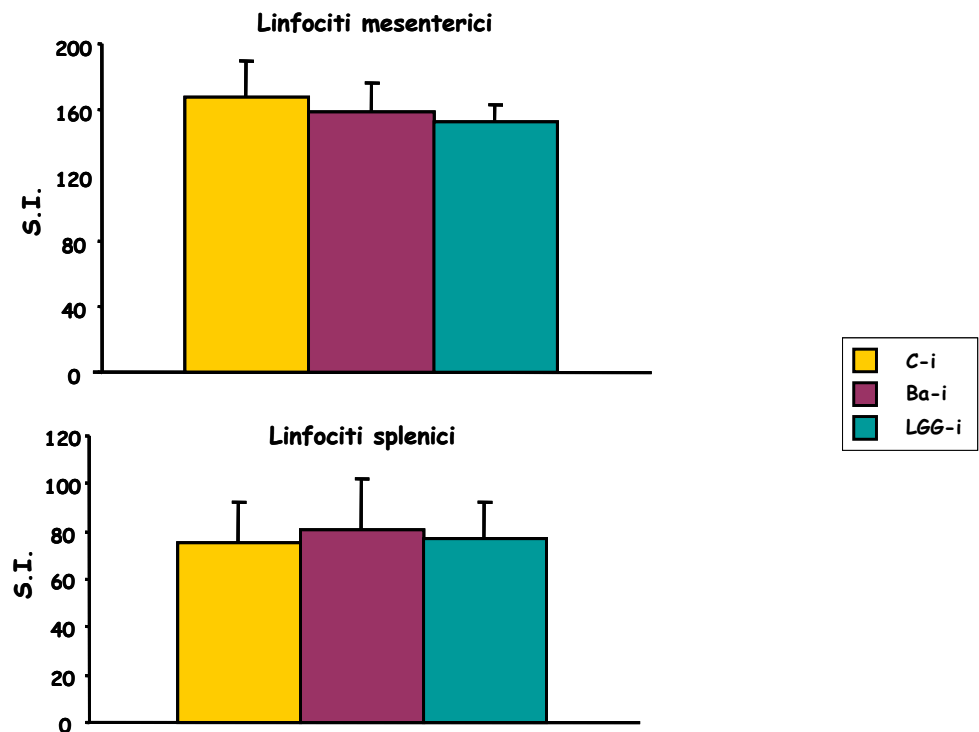


Fig. 11 -Risposta proliferativa alla ConA dei linfociti mesenterici e splenici dei ratti immunizzati.
 I linfociti (3×10^5 cellule/pozzetto) dei ratti non trattati (C-i) e trattati con probiotici (Ba-i e LGG-i), venivano messi in coltura in presenza o meno di 2,5 mg/ml di ConA, per 72 ore. La proliferazione cellulare veniva misurata come incorporazione di ^3H -timidina aggiunta nelle ultime 18 ore. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 20 animali.

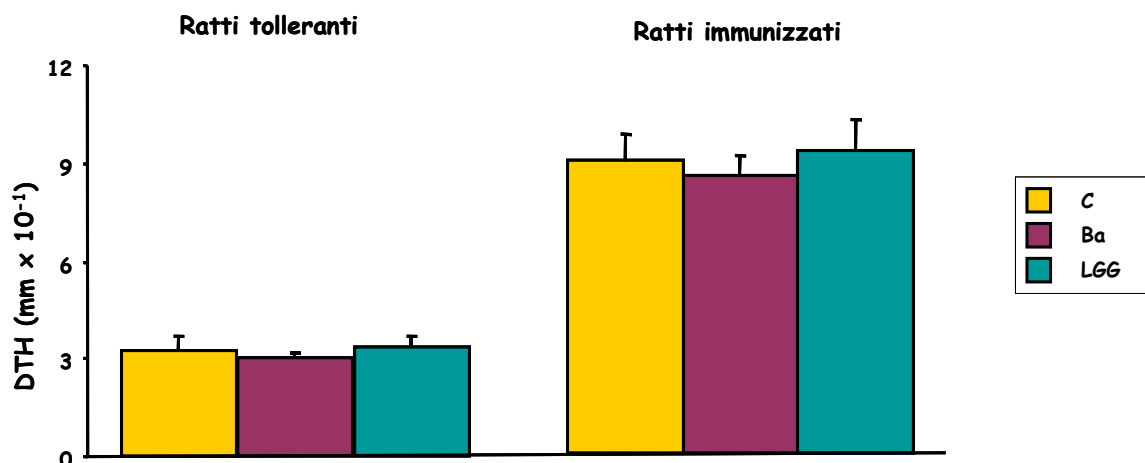


Fig. 12 - Risposta di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH) dei ratti tolleranti ed immunizzati.
 La risposta DTH veniva saggiata dopo iniezione con 25 mg di OVA in 50 ml di PBS sotto la pianta del piede della zampa sinistra, o con 50 ml di PBS sotto la pianta del piede della zampa destra. Il gonfiore sviluppato veniva misurato con un calibro dopo 24 ore dall' iniezione. I risultati sono espressi come differenza tra il gonfiore rilevato nella pianta del piede della zampa sinistra e quello del piede della zampa destra. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali.

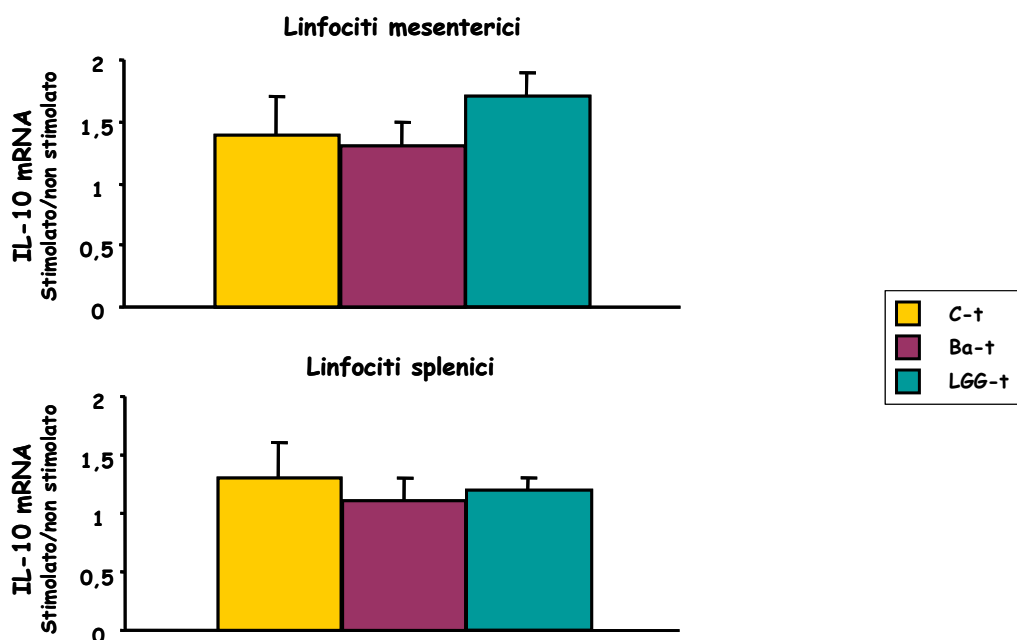


Fig. 13 -Espressione di IL-10 nei linfociti mesenterici e splenici dei ratti tolleranti.
 I linfociti (5×10^7 cellule) venivano messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. Le citochine venivano analizzate mediante RT-PCR. I valori densitometrici degli mRNA delle citochine delle cellule stimulate o meno, venivano normalizzati per mRNA dello standard interno GAPDH. I risultati sono riportati come rapporto di (mRNA IL-10/mRNA GAPDH) stimolato su (mRNA IL-10/mRNA GAPDH) non stimolato. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali.

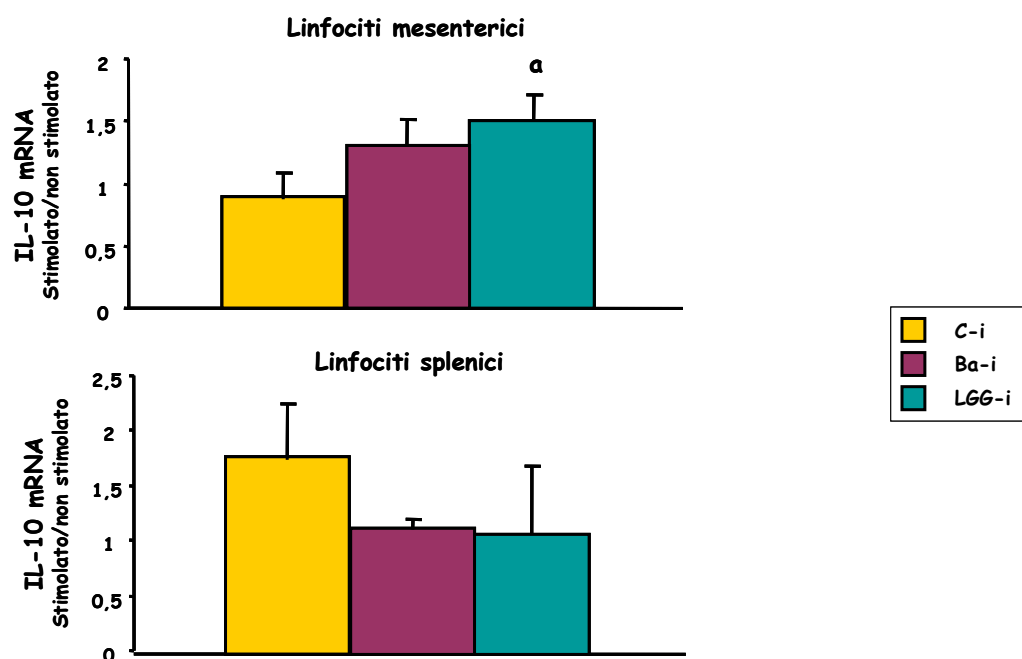


Fig. 14 -Espressione di IL-10 nei linfociti mesenterici e splenici dei ratti immunizzati.

I linfociti (5×10^7 cellule) venivano messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. Le citochine venivano analizzate mediante RT-PCR. I valori densitometrici degli mRNA delle citochine delle cellule stimolate o meno, venivano normalizzati per mRNA dello standard interno GAPDH. I risultati sono riportati come rapporto di (mRNA IL-10/mRNA GAPDH) stimolato su (mRNA IL-10/mRNA GAPDH) non stimolato. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali. (a: LGG-i vs Ci $P < 0,05$)

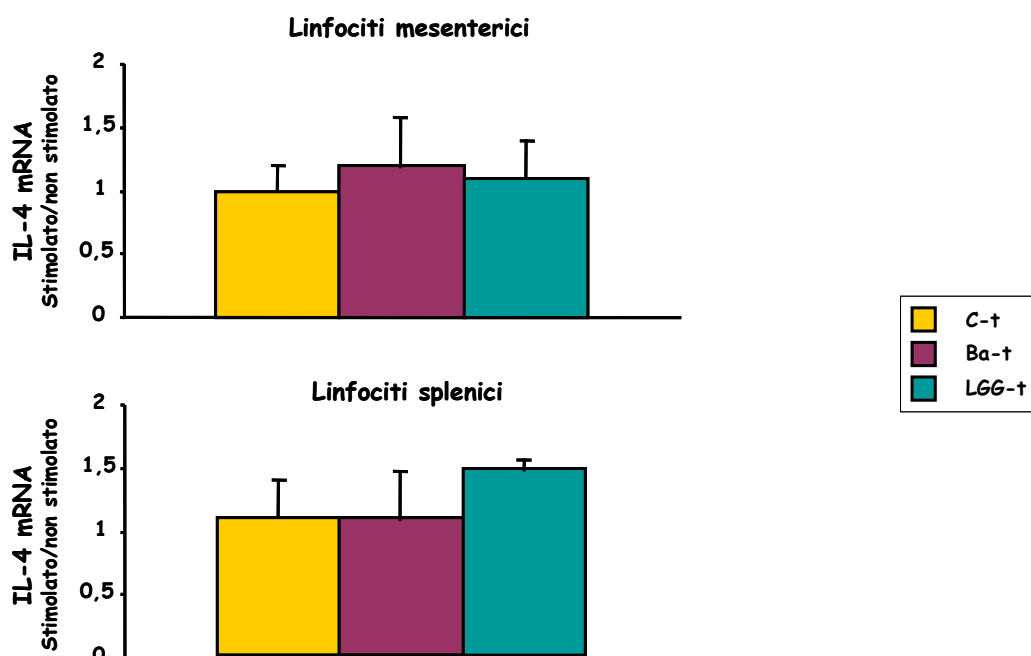


Fig. 15 -Espressione di IL-4 nei linfociti mesenterici e splenici dei ratti tolleranti.

I linfociti (5×10^7 cellule) venivano messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. Le citochine venivano analizzate mediante RT-PCR. I valori densitometrici degli mRNA delle citochine delle cellule stimolate o meno, venivano normalizzati per mRNA dello standard interno GAPDH. I risultati sono riportati come rapporto di (mRNA IL-4/mRNA GAPDH) stimolato su (mRNA IL-4/mRNA GAPDH) non stimolato. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali.

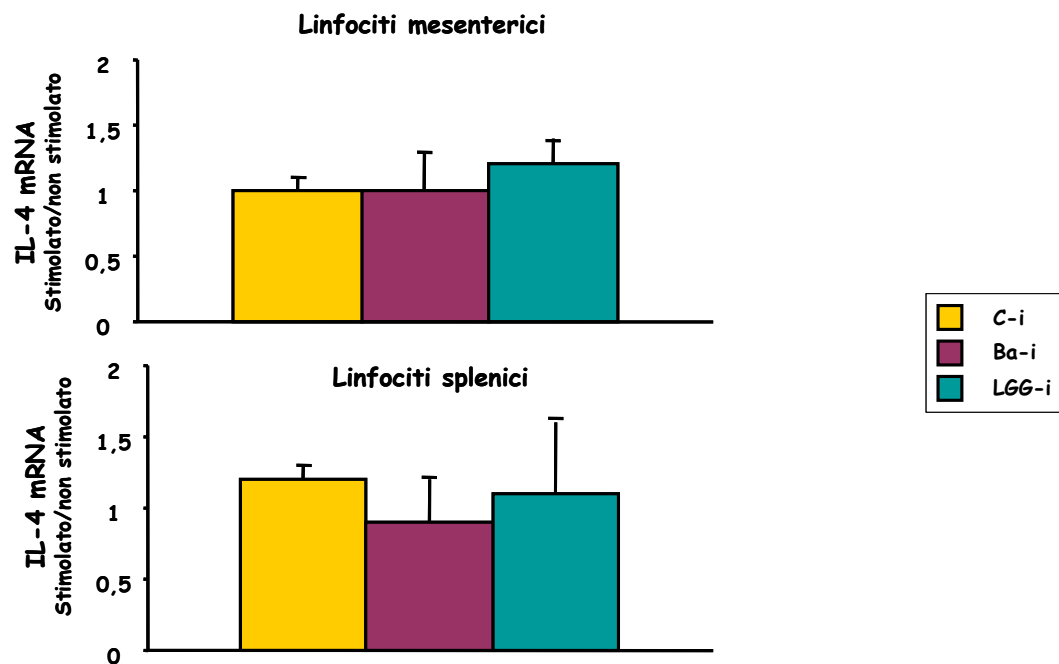


Fig. 16 -Espressione di IL-4 nei linfociti mesenterici e splenici dei ratti immunizzati.

I linfociti (5×10^7 cellule) venivano messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. Le citochine venivano analizzate mediante RT-PCR. I valori densitometrici degli mRNA delle citochine delle cellule stimulate o meno, venivano normalizzati per mRNA dello standard interno GAPDH. I risultati sono riportati come rapporto di (mRNA IL-4/mRNA GAPDH) stimolato su (mRNA IL-4/mRNA GAPDH) non stimolato. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali.

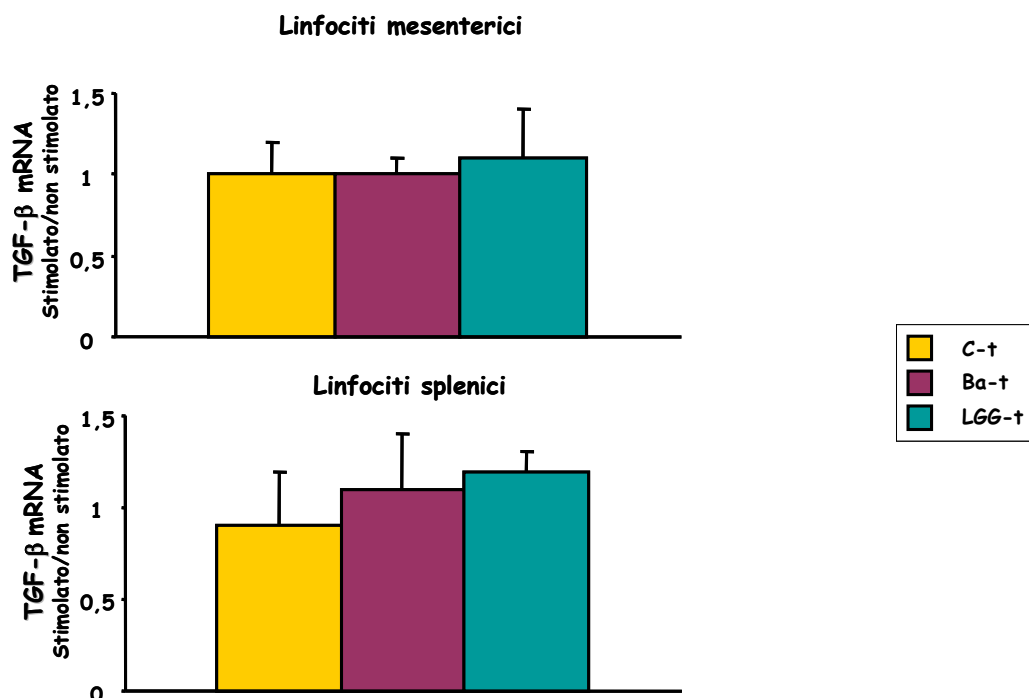


Fig. 17 -Espressione di TGF-β nei linfociti mesenterici e splenici dei ratti tolleranti.

I linfociti (5×10^7 cellule) venivano messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. Le citochine venivano analizzate mediante RT-PCR. I valori densitometrici degli mRNA delle citochine delle cellule stimulate o meno, venivano normalizzati per mRNA dello standard interno GAPDH. I risultati sono riportati come rapporto di (mRNA TGF-β /mRNA GAPDH) stimolato su (mRNA TGF-β /mRNA GAPDH) non stimolato. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali.

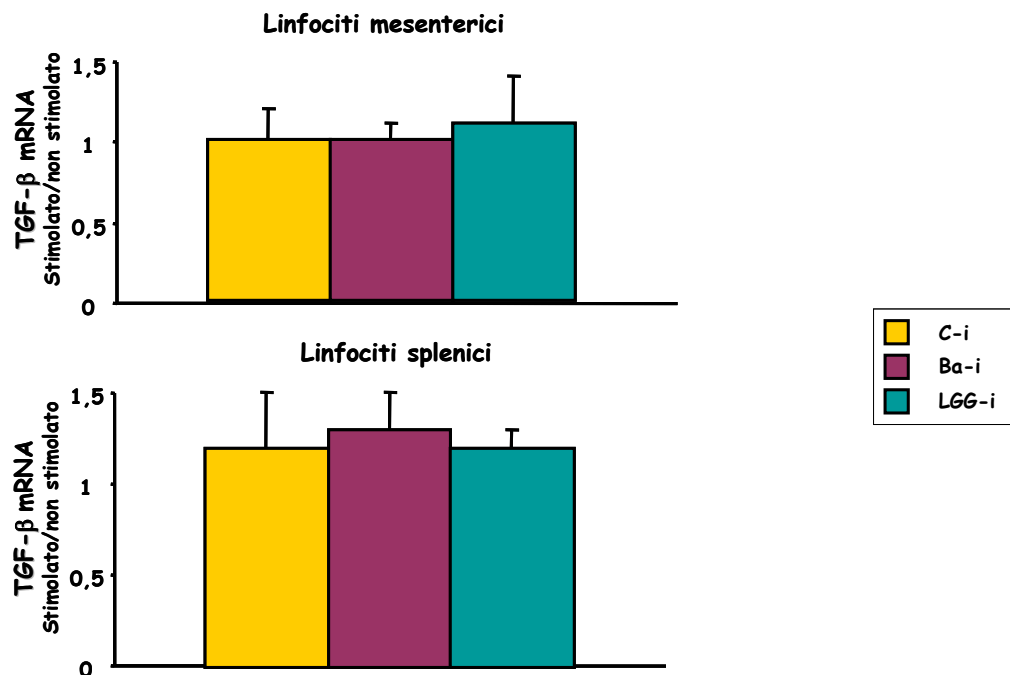


Fig. 18 -Espressione di TGF-β nei linfociti mesenterici e splenici dei ratti immunizzati.

I linfociti (5×10^7 cellule) venivano messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. Le citochine venivano analizzate mediante RT-PCR. I valori densitometrici degli mRNA delle citochine delle cellule stimulate o meno, venivano normalizzati per mRNA dello standard interno GAPDH. I risultati sono riportati come rapporto di (mRNA TGF-β /mRNA GAPDH) stimolato su (mRNA TGF-β /mRNA GAPDH) non stimolato. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali.

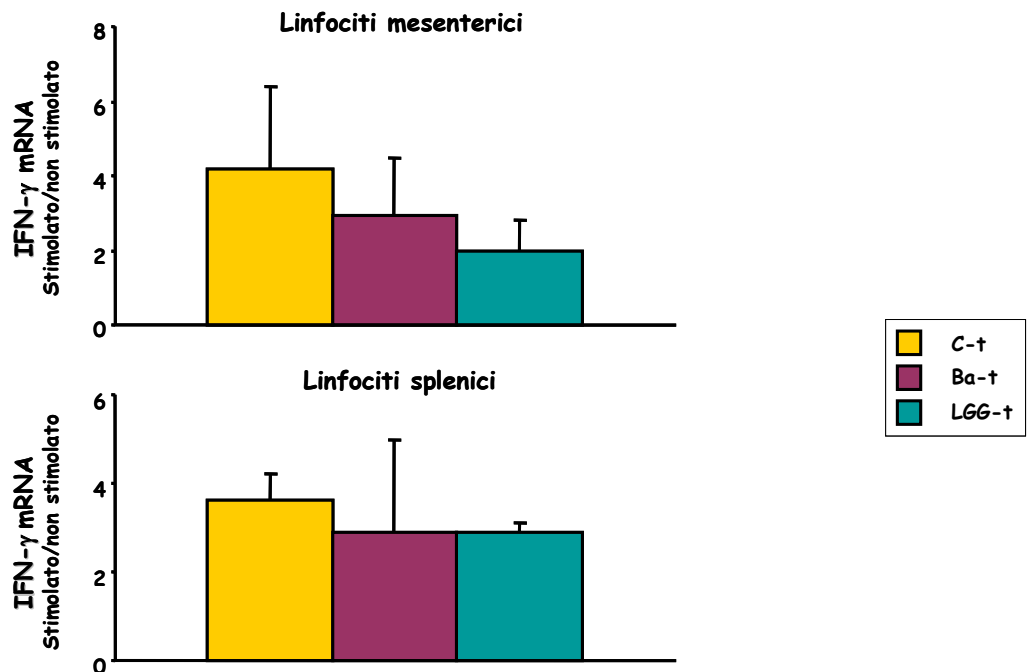


Fig. 19 -Espressione di IFN-γ nei linfociti mesenterici e splenici dei ratti tolleranti.

I linfociti (5×10^7 cellule) venivano messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. Le citochine venivano analizzate mediante RT-PCR. I valori densitometrici degli mRNA delle citochine delle cellule stimulate o meno, venivano normalizzati per mRNA dello standard interno GAPDH. I risultati sono riportati come rapporto di (mRNA IFN-γ/mRNA GAPDH) stimolato su (mRNA IFN-γ/mRNA GAPDH) non stimolato. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali.

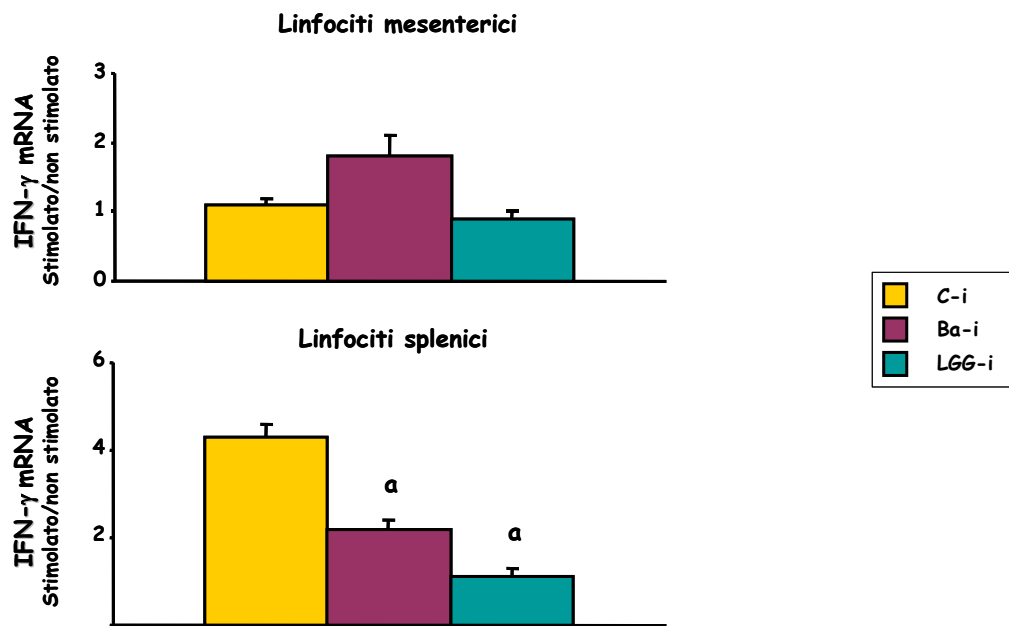


Fig. 20 -Espressione di IFN- γ nei linfociti mesenterici e splenici dei ratti immunizzati.

I linfociti (5×10^7 cellule) venivano messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. Le citochine venivano analizzate mediante RT-PCR. I valori densitometrici degli mRNA delle citochine delle cellule stimulate o meno, venivano normalizzati per mRNA dello standard interno GAPDH. I risultati sono riportati come rapporto di (mRNA IFN- γ /mRNA GAPDH) stimolato su (mRNA IFN- γ /mRNA GAPDH) non stimolato. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali. (a: Ba-i e LGG-i vs C-i $P < 0,01$)

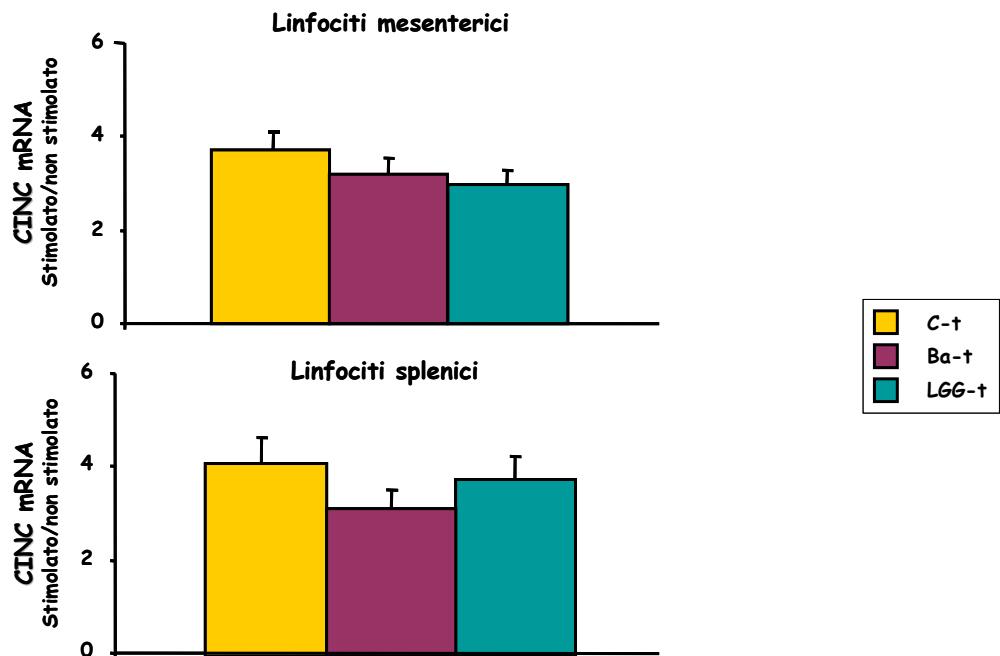


Fig. 21 -Espressione di CINC nei linfociti mesenterici e splenici dei ratti tolleranti.

I linfociti (5×10^7 cellule) venivano messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. Le citochine venivano analizzate mediante RT-PCR. I valori densitometrici degli mRNA delle citochine delle cellule stimulate o meno, venivano normalizzati per mRNA dello standard interno GAPDH. I risultati sono riportati come rapporto di (mRNA CINC/mRNA GAPDH) stimolato su (mRNA CINC/mRNA GAPDH) non stimolato. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali.

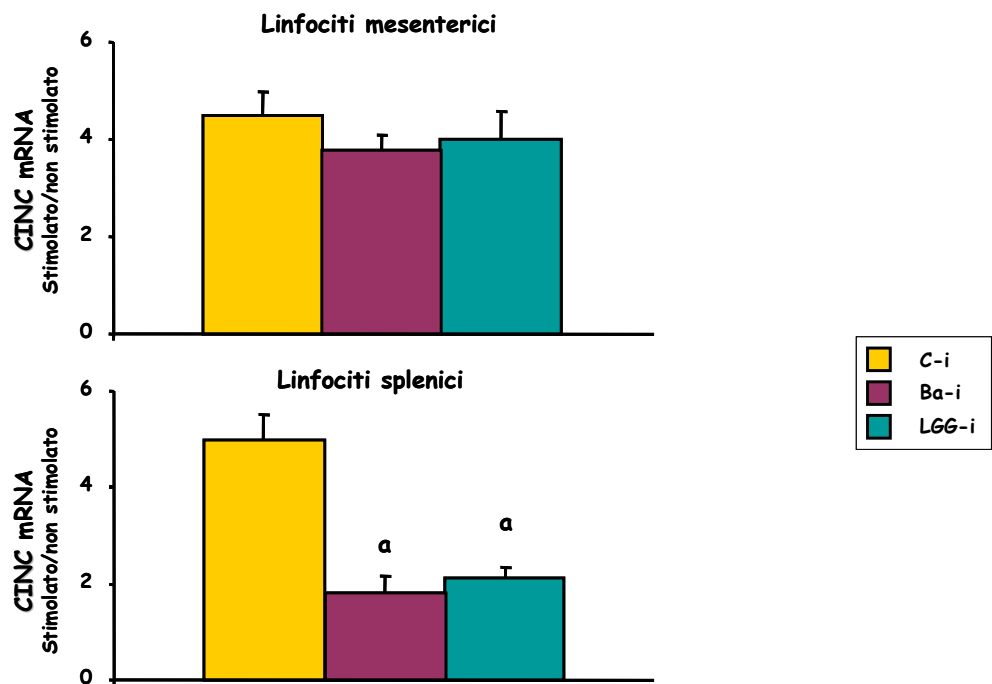


Fig. 22 -Espressione di CINC nei linfociti mesenterici e splenici dei ratti immunizzati.

I linfociti (5×10^7 cellule) venivano messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. Le citochine venivano analizzate mediante RT-PCR. I valori densitometrici degli mRNA delle citochine delle cellule stimulate o meno, venivano normalizzati per mRNA dello standard interno GAPDH. I risultati sono riportati come rapporto di (mRNA CINC/mRNA GAPDH) stimolato su (mRNA CINC/mRNA GAPDH) non stimolato. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali. (a: Ba-i e LGG-i vs C-i $P < 0,01$)

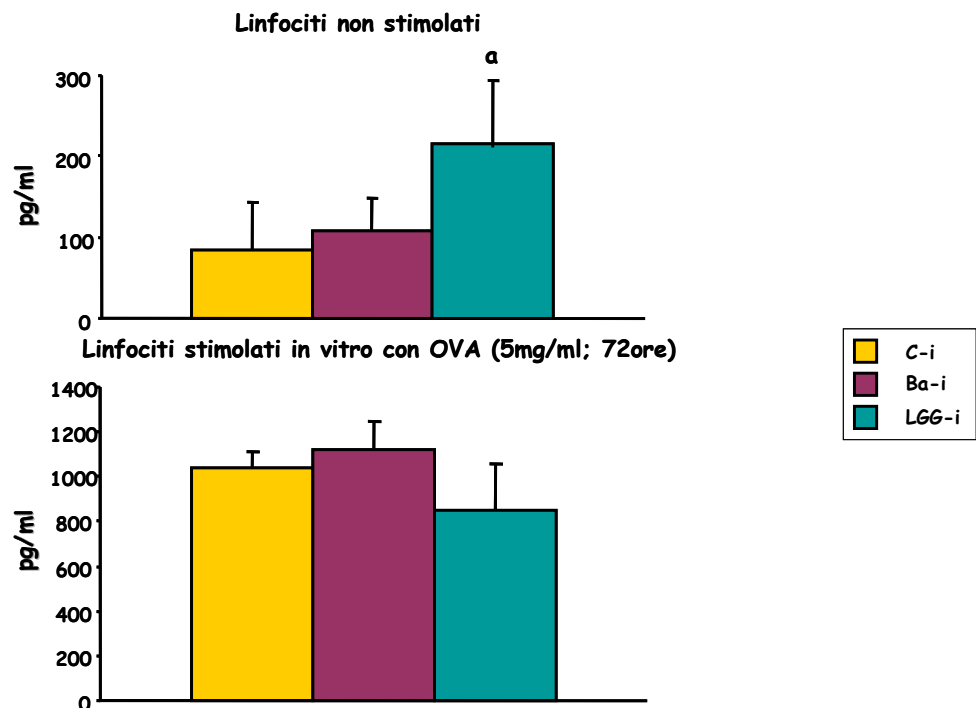


Fig. 23 -Secrezione di IL-10 nei linfociti mesenterici dei ratti immunizzati.

La secrezione di IL-10 veniva analizzata, mediante saggio ELISA, nei supernatanti dei linfociti mesenterici messi in coltura in presenza o meno di 5 mg/ml di OVA per 72 ore. I risultati sono espressi come pg/ml di proteina secreta. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali. (a: LGG-i vs C-i $P < 0,05$).

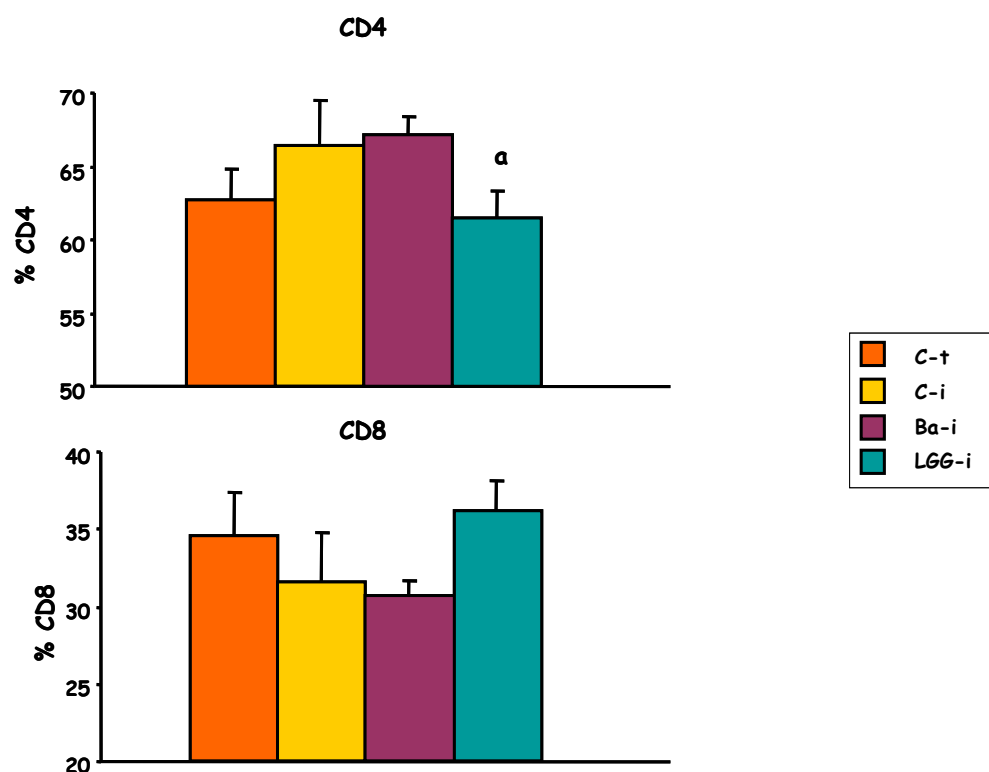


Fig. 24 -Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie mesenteriche dei ratti immunizzati.
Le sottopopolazioni linfocitarie venivano analizzate, mediante citofluorimetria a flusso, nei linfociti mesenterici di ratti immunizzati. I risultati sono espressi come % dei linfociti totali identificati dall'espressione del CD3. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali. (a: LGG-i vs C-i $P < 0,05$).

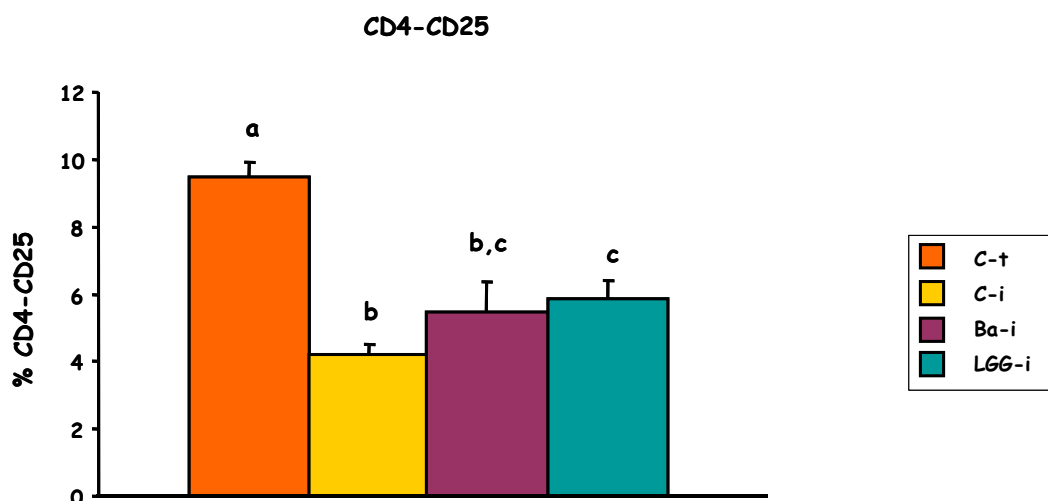


Fig. 25 -Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie mesenteriche dei ratti immunizzati.
Le sottopopolazioni linfocitarie venivano analizzate, mediante citofluorimetria a flusso, nei linfociti mesenterici di ratti immunizzati. I risultati sono espressi come % dei linfociti totali identificati dall'espressione del CD3. I dati rappresentano le medie $\pm$ SEM di almeno 8 animali. Lettere diverse indicano differenze significative ($P < 0,05$).

5. DISCUSSIONE

E' in continuo aumento l'interesse verso i probiotici e un loro potenziale uso terapeutico per i numerosi effetti benefici a loro attribuiti, quali la capacità di ristabilire un normale livello di permeabilità intestinale ed una equilibrata microflora, il rafforzamento della funzione di barriera immunologica svolta dall'intestino, la riduzione della risposta infiammatoria intestinale e dell'espressione delle citochine tipiche di stati infiammatori/allergici locali e sistemici.

L'induzione ed il mantenimento della tolleranza orale sono importanti meccanismi per conservare l'equilibrio del sistema immunitario ed evitare risposte indesiderate ad alimenti o a componenti della flora batterica normalmente presente nell'intestino. La rottura della tolleranza orale, dovuta a squilibri del sistema immunitario intestinale, porta a risposte immunitarie dirette verso antigeni alimentari, con sviluppo di infiammazioni, ma anche a reazioni dirette verso gli autoantigeni e quindi allo sviluppo di malattie autoimmuni.

E' sempre più evidente che la perdita di tolleranza verso la flora intestinale è un evento cruciale nella patogenesi di malattie infiammatorie intestinali, quali la colite ulcerosa e la malattia di Chron (Duchmann et al. 1995).

Come detto prima, la presenza di una equilibrata microflora intestinale è essenziale per la salute dell'individuo e per il corretto sviluppo del GALT.

E' ormai noto che i probiotici hanno un ruolo importante nel mantenere la normale composizione della flora intestinale e nel prevenire così lo sviluppo di varie infezioni intestinali e condizioni infiammatorie.

Secondo la “hygiene hypothesis”, l’aumento di allergie alimentari multiple chiamate disturbi atopici sarebbe dovuto al miglioramento delle condizioni igieniche, che porta ad una minor esposizione a carichi batterici e conseguente non corretta stimolazione del sistema immunitario intestinale. In particolare è stato recentemente visto che tra i batteri della flora intestinale sono i probiotici ad essere responsabili della formazione di una corretta risposta immunitaria, e che il trattamento con probiotici sembra portare ad un miglioramento nelle allergie alimentari, disturbi autoimmuni e tolleranza orale (Isolauri, 2001; Dugas, 1999).

In natura, infatti, la colonizzazione intestinale da parte dei batteri enterici inizia subito dopo la nascita quando il neonato, durante il parto, viene a contatto con la flora intestinale materna, ma solo dopo lo svezzamento la composizione della sua microflora inizia a divenire simile a quella di un adulto. A circa un anno di vita il sistema immunitario del bambino è quasi maturo e sviluppa la tolleranza orale.

Sebbene i probiotici siano da molto tempo degli importanti costituenti della nostra dieta, è da pochi anni che le ricerche si sono indirizzate a comprendere il loro ruolo nel promuovere o mantenere condizioni fisiologiche ottimali per le cellule intestinali e prevenire lo sviluppo di patologie che coinvolgono il sistema immunitario. Tuttavia, non è stato ancora ben definito il ruolo dei probiotici nel modulare la risposta immunitaria intestinale.

In questo lavoro riportiamo dei risultati che dimostrano l’induzione di una risposta di tipo tollerogenico a livello intestinale da parte dei probiotici *B. animalis* MB5 (Ba) e *L. casei* subsp. *rhamnosus* GG (LGG) in ratti immunizzati con l’antigene alimentare OVA. Si osservava infatti, che la risposta proliferativa all’OVA nei ratti immunizzati con lo stesso antigene era notevolmente ridotta nei linfociti mesenterici

negli animali trattati con i probiotici rispetto a quelli non trattati, mentre nella milza non si evidenziava alcuna riduzione. In aggiunta, Ba riduceva ulteriormente la proliferazione a livello intestinale anche nei ratti resi tolleranti verso l'OVA, dove già la risposta proliferativa all'OVA era bassa.

I nostri dati mostrano inoltre che la capacità proliferativa generale dei linfociti non veniva alterata dal trattamento con i probiotici neanche a livello mesenterico, infatti la risposta proliferativa verso il mitogeno policlonale ConA risultava elevata ed uguale in tutti i gruppi di ratti analizzati. Questi dati suggeriscono che l'osservata riduzione della proliferazione linfocitaria mesenterica dei ratti immunizzati e trattati con i probiotici è antigene specifica.

L'effetto inibitorio svolto dai probiotici nei confronti della risposta immunitaria verso l'OVA si attuava solo a livello intestinale, in quanto sia la risposta proliferativa a livello splenico che la risposta DTH non venivano modificate. Queste risultavano infatti ugualmente elevate nei tre gruppi di ratti immunizzati, a suggerire che la sensibilizzazione all'OVA era mantenuta a livello periferico.

Presi complessivamente, questi dati indicano un nuovo ruolo di Ba e LGG nel regolare la risposta immunitaria intestinale attraverso inibizione della proliferazione linfocitaria mesenterica pur mantenendo la capacità del sistema immunitario sistemico di rispondere ad un antigene estraneo.

Diversi studi hanno indicato che la risposta immunitaria contro antigeni alimentari in soggetti allergici diminuisce dopo trattamento con probiotici (Pessi, 1999; Peltó, 1998). Un ruolo importante è svolto dall'LGG che è stato visto essere in grado di diminuire i sintomi della dermatite atopica in bambini e di ridurre lo sviluppo di tale disturbo in neonati le cui mamme avevano ricevuto il lattobacillo durante la

gravidanza e l'allattamento (Majamaa and Isolauri, 1997; Kalliomaki, 2001). I nostri risultati, mostrando che Ba e LGG inducono uno stimolo tollerogenico, contribuiscono a rafforzare l'ipotesi che alcuni probiotici possono evitare lo sviluppo di immunopatologie dirette verso antigeni presenti nell'ambiente intestinale e ridurre reazioni di tipo allergico ed autoimmune, mantenendo la giusta composizione della flora intestinale.

Che i probiotici usati in questo studio fossero in grado di colonizzare il tratto intestinale e quindi di modificare la microflora, era stato dimostrato da studi precedenti. Infatti, Ba è stato trovato nelle feci di ratti precedentemente trattati con lo stesso batterio, fino ad una settimana dopo la fine della somministrazione (Mengheri et al., 1999), e LGG continuava ad essere presente nelle feci fino a due settimane dopo la sospensione della somministrazione (Goldin et al., 1992).

E' ben noto che uno dei principali meccanismi di induzione della tolleranza orale è la soppressione dell'attivazione linfocitaria, attraverso la produzione di citochine regolatorie. I linfociti, in seguito al riconoscimento dell'antigene, secernono citochine soppressorie, quali IL-10, IL-4 e TGF- β (Simecka, 1998; Weiner, 2001). I nostri risultati indicano che il trattamento con LGG induce un aumento dell'espressione di IL-10 nei linfociti mesenterici dei ratti immunizzati, mentre non modifica quella del TGF- β e della IL-4. Questi dati, insieme alla ridotta risposta proliferativa all'OVA, suggeriscono che nel nostro modello sperimentale, la IL-10 è la citochina che risulta coinvolta nell'indurre uno stimolo tollerogenico da parte di LGG. Questo è in accordo con le numerose evidenze che suggeriscono un'azione modulatrice dei batteri acido lattici nella risposta immunitaria sia sulla produzione

di anticorpi che su quella di citochine (Perdigon, 1992; Tejada-Simon, 1999; Link-Amster, 1994; von der Weid, 2001; Haller, 2000).

La IL-10 è una citochina importante per il mantenimento della tolleranza orale nell'intestino, e per prevenire lo sviluppo quindi di patologie intestinali di tipo infiammatorio. Infatti, topi knockout per IL-10 sviluppavano IBD, ma se veniva ripristinato un livello fisiologico per tale citochina lo sviluppo di detta malattia era prevenuto (Kuhn et al. 1993). Inoltre, topi knockout per IL-10 infettati con *Helicobacter hepaticus* sviluppavano infiammazione intestinale di tipo Th1, mentre i topi wild-type che producevano IL-10 rimanevano sani (Kullberg et al. 1998). Esperimenti condotti su animali in cui era stata indotta sperimentalmente la colite avevano dimostrato che la tolleranza verso la flora intestinale endogena era abrogata e veniva ripristinata col trattamento con IL-10 (Duchmann et al. 1996).

Diversi studi hanno dimostrato che i probiotici possono indurre la IL-10, e la soppressione di patologie con risposta infiammatoria di tipo Th1. Infatti, è stato dimostrato che si poteva prevenire la comparsa della colite ulcerosa in topi mediante trattamento con *Lactococcus lactis* ingegnerizzato a produrre IL-10 (Steidler et al. 2000). Inoltre, la somministrazione di una miscela di lattobacilli e bifidobatteri a pazienti affetti da paucite portava a un significativo aumento della concentrazione di IL-10 associata ad un miglioramento della malattia (Ulissee et al. 2001). I nostri risultati mostrano non solo un alto livello di espressione genica di IL-10 nei linfociti mesenterici dei ratti immunizzati trattati con LGG rispetto ai ratti solo immunizzati, ma anche un livello più alto della proteina IL-10 secreta dai linfociti mesenterici di ratti alimentati con tale probiotico non stimolati *in vitro* con OVA, rispetto al controllo immunizzato. Considerando che i linfociti non stimolati

in vitro con l'antigene rispecchiano la situazione fisiologica dell'animale *in vivo*, quest'ultimo risultato suggerisce che il trattamento con LGG induce nel ratto un aumento della secrezione di base di IL-10 che sembra essere responsabile dell'effetto tollerogenico osservato a livello intestinale.

E' noto già da tempo che l'attivazione dei linfociti CD4⁺, in presenza di IL-10, induce un nuovo fenotipo di cellule chiamate Tr1, caratterizzate dall'avere una bassa capacità proliferativa ed un'alta capacità di produrre IL-10. E' stato anche visto che questa popolazione era in grado di prevenire lo sviluppo della colite in topi SCID (severe combined immune deficient; Groux et al. 1997). L'induzione di questa popolazione linfocitaria, e la sua attività sembrano essere regolate da componenti della flora batterica. Infatti, recenti studi hanno messo in evidenza che il trattamento dei linfociti splenici murini con *L. paracasei* favoriva lo sviluppo di una popolazione di cellule T CD4⁺, che mostrava una ridotta capacità proliferativa e che manteneva una buona produzione di IL-10 (von der Weid et al. 2001).

I nostri dati dell'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie hanno mostrato che il trattamento con LGG di ratti immunizzati induceva una diminuzione della classe di linfociti mesenterici CD4⁺ rispetto a quella dei ratti solo immunizzati, e portava la sottopopolazione linfocitaria mesenterica CD4⁺-CD25⁺ verso un livello intermedio tra quello presente nei ratti di controllo tolleranti e quelli immunizzati. E' noto che i linfociti T CD4⁺ in grado di sopprimere la proliferazione e di secernere elevate quantità di IL-10, esprimono costitutivamente il CD25 (Levings et al., 2002), e fanno parte di quella classe di linfociti T_{reg} con funzioni regolatorie, cioè in grado di sopprimere una gamma di risposte immunitarie indesiderate e mantenere uno stato di tolleranza. Considerando questi dati, i nostri risultati suggeriscono che LGG è in

grado di promuovere una risposta tollerogenica a livello intestinale mediante induzione *in vivo* di una popolazione di linfociti mesenterici simile a Tr1, con una bassa capacità proliferativa ed elevata produzione di IL-10.

L'espressione genica della IL-10 non risultava invece aumentata a seguito del trattamento con Ba, che tuttavia era in grado di indurre una diminuzione di proliferazione nei linfociti mesenterici dei ratti sia immunizzati che tolleranti. Questo dato suggerisce che l'attività tollerogenica svolta da Ba non si attua mediante la produzione di IL-10, ma potrebbe coinvolgere altri meccanismi che intervengono nell'induzione ed il mantenimento della tolleranza orale, quali anergia o delezione clonale. Ulteriori esperimenti sono necessari per chiarire questo punto. Il fatto che i due probiotici attivino una simile risposta di tipo tollerogenico ma con meccanismi diversi non è sorprendente in quanto precedenti lavori avevano dimostrato che ceppi diversi di probiotici potevano avere una diversa azione sul sistema immunitario (Ibnou-Zekri et al., 2003).

I nostri dati evidenziano che oltre ad indurre uno stimolo tollerogenico a livello intestinale, Ba e LGG sono in grado di ridurre la risposta di tipo infiammatorio anche a livello splenico. Infatti sia IFN- γ che CINC sono notevolmente ridotti nei linfociti splenici dei ratti immunizzati trattati con questi batteri. Queste due citochine non risultano invece modificate a livello mesenterico, indicando che Ba e LGG inducono una risposta differente a livello locale e periferico.

Tutte le citochine analizzate, sia le pro- che le anti-infiammatorie, non si ritrovano invece modificate nei ratti tolleranti trattati con probiotici. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che esiste già un alto livello di espressione di IL-10, IL-4 e TGF- β e un basso livello di IFN- γ e CINC nei ratti di controllo, che il trattamento con

probiotici non varia, probabilmente grazie ad un meccanismo di autoregolazione tra la citochine stesse.

In letteratura ci sono pareri discordanti riguardo il ruolo svolto dai probiotici nella modulazione dell'espressione delle citochine infiammatorie. Alcuni studi riportano infatti un aumento di IL-12, TNF- α e IFN- γ in PBMC, monociti o splenociti trattati con batteri lattici (Miettinen et al., 1998; Hessle et al., 2000; Kato et al., 1999). Tuttavia, è stato anche mostrato che LGG era in grado di ridurre la produzione di IFN- γ da parte di linfociti splenici di topi in cui era stata indotta l'artrite reumatoide (Kato et al. 1998), e che *L. plantarum* e una miscela di probiotici potevano indurre una diminuzione di espressione di IFN- γ e IL-12 in topi knockout per IL-10 (Schultz et al. 2002; Madsen 1999). Infine, è stato dimostrato che era possibile avere un aumento o una diminuzione di IL-12, IL-6 e IFN- γ a seconda delle cellule in cui si analizzavano tali citochine e che la risposta cambiava a seconda del ceppo di probiotici usati (Tejada-Simon et al. 1999), suggerendo quindi che i vari ceppi di probiotici possono esplicare attività diverse tra loro, anche in relazione alle cellule considerate.

In conclusione, il nostro studio ha messo in evidenza un nuovo ruolo svolto dai probiotici quali induttori di uno stimolo tollerogenico, contribuendo a chiarire i meccanismi con cui alcuni probiotici possono esplicare la loro attività immunomodulatoria. E' possibile che LGG espliciti la sua funzione tollerogenica mediante induzione *in vivo* di una popolazione di cellule Tr1, che hanno una ridotta capacità di proliferazione e una elevata capacità di produrre IL-10. Inoltre Ba e LGG sono in grado di modulare la risposta infiammatoria anche a livello splenico, riducendo l'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie.

Questi probiotici appaiono così dei promettenti candidati non solo per il trattamento di condizioni infiammatorie intestinali e per la riduzione di reazioni di tipo allergico ed autoimmune, mantenendo la giusta composizione della flora intestinale, ma anche per la tutela delle condizioni fisiologiche ottimali dell'intestino.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbas A.K.**, Murphy K.M., Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.
- Akira S.** and Takeda K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499-511.
- Allez M.** and Mayer L. (2004) Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm. Bowel Dis.* 10 (5): 666-676.
- Alm L.** (1983) Survival rate of *Salmonella* and *Sigheilla* in fermented milk products with and without added human gastric juice. An in vitro study. *Prog. Food Nutr. Sci.* 7: 19-23.
- Aroeira L.S.**, Cardillo F., De Albuquerque D.A., Vaz N.M., Mengel J. (1995) Anti-IL-10 treatment does not block either the induction or the maintenance of orally induced tolerance to OVA. *Scand. J. Immunol.* 41: 319-323.
- Ayrolidi E.**, Zollo O., Cannarile L., D'Adamio F., Grohmann U., Delfino D.V., Riccardi C. (1998) Interleukin-6 (IL-6) prevents activation induced cell death: IL-2-independent inhibition of CD95/CD95L expression and cell death. *Blood* 9: 4212-4219.
- Baggi F.**, Andreetta F., Caspani E., Milani M., Longhi R., Mantegazza R., Cornelio F., Antozzi C. (1999) Oral administration of an immunodominant T-cell epitope downregulates Th1/Th2 cytokines and prevents experimental myasthenia gravis. *J. Clin. Invest.* 104: 1287-1295.
- Baggiolini M.**, Loetscher P & Moser B (1995) Interleukin-8 and the chemokine family. *Int. J. Immunopharmacol.* 17: 103-108.
- Ballongue, J.** (1993) Bifidobacteria and probiotic action. In: *Lactic acid bacteria* (Salminen, A., Von Wreight A., eds.), pp. 357-428. Marcel Dekker, New York.
- Barefoot S.F.**, Klaenhammer T.R. (1983) Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1808-1812.
- Beagley K.W.**, Eldrige J.H., Lee F., Kiyono H., Everson M.P., Koopman W.J., Hirano T., Kishimoto T., McGhee J.R. (1989) Interleukins and IgA synthesis: Human and murine IL-6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *Journal of Experimental Medicine* 169: 2133-2148.
- Bendtzen K.** (1988) Interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol. Lett.* 19: 183-192.
- Bernet M.F.**, Brassart D., Neeser J.R., Servin A.L., (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35: 483-489.
- Biavati B.**, Mattarelli P., Alessandrini A., Crociati F., Guerrini M. (1995) Survival in fermented milk products of *B. animalis* and its recovery in human faeces. *Microecol. Ther.* 25: 231-235.
- Bischoff S.**, Crowe SE. (2004) Food allergy and the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol.* 20(2): 156-161.

- Borruel N.**, Carol M., Casellas F., Antolin M., de Lara F., Espin E., Naval J., Guarner F., Malagelada J.R. (2002) Increased mucosal TNF- α production in Chron's disease can be downregulated *ex vivo* by probiotic bacteria. *Gut* 51: 659-664.
- Bouhnik Y.**, Pochart P., Marteau P., Arlet G., Goderel I., Rambaud J.C. (1992) Fecal recovery of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 102: 875-878.
- Brandtzaeg P.** (1996) History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann. New York Acad. Sci.* 778.
- Brandtzaeg P.** (1997) Mechanisms of gastrointestinal reactions to food. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 4: 9-24.
- Brandtzaeg P.** (1998) Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr. Rev.* 56: S5-S18.
- Campbell D.J.**, Kim C.H. and Butcher E.C. (2003) Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol. Rev.* 195: 58.
- Cario E.** (2005) Bacterial interactions with cells of intestinal mucosa: toll-like receptors and NOD2. *Gut* 54: 1182-1193.
- Cario E.**, Brown D., McKee M., Lynch-Devaney K., Gerken G., Podolsky D.K. (2002) Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am. J. Pathol.* 160: 165-173.
- Chandra R.K.** (1997) Food hypersensitivity and allergic disease: a selectic review. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 526S-529S.
- Chen Y.**, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 26;265(5176): 1237-40.
- Chen Y.**, Inobe J., Marks R., Gonnella P., Kuchroo V.K., Weiner H.L. (1995) Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376: 177-180.
- Chen Y.**, Inobe J., Weiner H.L. (1995) Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4⁺ and CD8⁺ cells mediate active suppression. *J. Immunol.* 155: 910 – 916.
- Chen W.** and Wahl S.M. (2003) TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14 (2): 85-89.
- Cheroutre H.** (2004) Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 217-246.
- Chin J.**, Turner B., Barchia I., Mullbacher A. (2000) Immune response to orally consumed antigens and probiotic bacteria. *Immunology and cell biology* 78: 55-66.
- Christensen H.R.**, Frokiaer H., Petska J.J. (2002) Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol.* 168: 171-178.
- Coconnier M.H.**, Klaenhammer T.R., Kernéis S., Bernet M.F., Servin A.L. (1992) Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environm. Microbiol.* 2034-2039.

- de Roos N.M.**, Katan M.B. (2000) Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 405-411.
- De Vrese M.**, Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C., Schrezenmeir J. (2001) Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clinical Nutrition* 73: 421S-429S.
- Di Giacinto C.**, Marinaro M., Sanchez M., Strober W. and Boirivant M. (2005) Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J. Immunol.* 174 (6): 3237-3246.
- Donnet-Hughes A.**, Rochat F., Serrant P., Aeschlimann J.M., Schiffrin E.J. (1999) Modulation of non-specific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J. Dairy Sci.* 82:863-869.
- Duchmann R.**, Kaiser I., Hermann E., Mayet W., Ewe K., Meyer zum Buschenfelde K.H. (1995) Related Articles Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol.* 102, 3: 448-455.
- Duchmann R.**, Schmitt E., Knolle P., Meyer zum Buschenfelde K.H., Neurath M. (1996) Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur. J. Immunol.* 26, 4: 934-938.
- Dugas B.**, Mercenier A., Lenoir-Wijnkoop I., Arnaud C., Dugas N., Postaire E. (1999) Immunity and probiotics. *Immunol. Today.* 20(9): 387-390.
- Fabia R.**, Ar'Rajab A., Johansson M.L., Willen R., Andersson R. (1993) The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 28: 155-162.
- Fedorak RN**, Madsen KL. (2004) Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. *Curr Opin Gastroenterol.* 20(2): 146-55.
- Finamore A.**, Roselli M., Merendino N., Nobili F., Vignolini F., Mengheri E. (2003) Zinc deficiency suppresses the development of oral tolerance in rats. *J Nutr* 133, 191-198.
- Finkelman F.D.**, Urban J.F., Beckman M.P., Schooley K.A., Homes J.M., Katona I.M. (1991) Regulation of murine in vivo IgG and IgE response by a monoclonal anti-IL-4 receptor antibody. *Int. Immunol.* 3: 599-607.
- Friedman A.**, Weiner H.L. (1994) Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 6688-6692.
- Fuller R.** (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Garcia-Lafuente A.**, Antolin M., Guarner F., Crespo E., Malagelada J-R. (2001) Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut* 48: 503-507.
- Gaside P.** Steel M., Worthey E.A., Satoskar A., Alexander J., Bluethmann H., Liew F.Y., Mowat A.M. (1995) T-helper-2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. *J. Immunol.* 154: 5649-5655.
- Gill H.S.**, Guarner F. (2004) Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad. Med. J.* 80: 516-526.

- Gill HS**, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. (2000) Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). Br J Nutr. 83(2):167-76.
- Gilliland S. E.**, Speck M.L. (1977) Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. 33: 15-18.
- Goldin B.R.**, Gorbach S.L. (1984) The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacteria enzyme activity. Am. J. Clinical Nutrition 39: 756-761.
- Goldin B.R.**, Gorbach S.L., Saxelin M. et al. (1992) Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in the human gastrointestinal tract. Dig. Dis. Sci. 37: 121-128.
- Gonnella P.A.**, Chen Y., Inobe J.I., Quartulli M., Weinwr H.L. (1998) In situ immune response in gut associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TcR transgenic mice. Journal of Immunology 160: 4708-4718.
- Goossens D.**, Jonkers D., Stobberingh E., van den Bogard A., Russel M., Stockbrugger R. (2003) Probiotics in gastroenterology: indications and future perspectives. Scand. J. Gastroenterol. S239: 15-23.
- Gopal P.K.**, Prasad J., Smart J., Gill H.S. (2001) In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. International Journal of Food Microbiology 67: 207-216.
- Gorbach S.L.**, Chang T.W., Goldin B. (1987) Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. Lancet ii: 1519-1526.
- Gordon J.I.**, Hooper L.V., McNevin M.S., Wong M., Bry L. (1997) Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. Am. J. Physiol. 273: G565-G570.
- Gotsman I.**, Shlomai A., Alper R., Rabbani E., Engelhardt D., Ilan Y. (2001) Amelioration of immune-mediated experimental colitis: tolerance induction in the presence of preexisting immunity and surrogate antigen bystander effect. J. Pharmacol. Exp. Ther. 297: 926-932.
- Groux H.**, O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries E., Roncarolo M.G. (1997) A CD4⁺ T cell subset inhibits antigen specific T cell responses and prevents colitis. Nature 389: 737-742.
- Guarino A.**, Canari R.B., Spagnuolo M.I., Albano F., DiBenedetto L. (1997) Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms of viral excretion in children with mild diarrhea. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 25: 516-519.
- Haller D.**, Blum S., Bode C., Hammes W.P., Schiffrin E.J. (2000) Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets. Infection and Immunity 68: 752-759.
- Haller D.**, Bode C., Hammes W.P., Pfeifer A.M.A., Schiffrin E.J., Blum S. (2000) Non pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. Gut 47: 79-87.

- Hanada T.**, Yoshimura A. (2002) Regulation of cytokine signalling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 413-421.
- Hart A.L.**, Stagg A.J., Frame M., Graffner H., Glise H., Falk P., Kamm M.A. (2002) Review article: the role of gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 1383-1393.
- Hayday A.**, Theodoridis E., Ramsburg E. and Shires J. (2001) Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nature Immunol.* 2: 997.
- Hessle C.**, Hanson L.A., Wold A.E. (1999) *Lactobacilli* from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12. *Clin. Exp. Immunol.* 116: 276-282.
- Hessle C.**, Andersson B, Wold AE. (2000) Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun.* 68(6): 3581-3586.
- Huang J.S.**, Bousvaros A., Lee J.W., Diaz A., Davidson E.J. (2002) Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* 47: 2625-2634.
- Husby S.** (2000) Normal immune responses to ingested foods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30: S13-S19.
- Ibnou-Zekri N**, Blum S, Schiffrin EJ & von der Weid T (2003) Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties *in vitro*. *Infect Immun* 71, 428-436.
- Isolauri E** (2001) Probiotics in the prevention and treatment of allergic disease. *Pediatr Allergy Immunol.* 12: 56-59.
- Isolauri E.**, Kalia M., Mykkanen H., Ling W.H., Salminen S. (1994) Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig. Dis. Sci.* 39: 2595-2600.
- Isolauri E.**, Majamaa H., Arvola T., Rantala I., Virtanen E., Arvilommi H. (1993) *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 105: 1643-1650.
- Iwasaki A.**, Dinarello C.A. (1999) Mucosal immunity and inflammation. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T-cells responses. *Am. J. Physiol.* 276: G1974-G19778.
- Kaila M.**, Isolauri E., Soppi E., Virtanen V., Laine S., Arvilommi H. (1992) Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhoea by a human *Lactobacilli* strain. *Pediatric Res.* 32: 141-144.
- Kalliomaki M.**, Isolauri E. (2003) Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 3(1): 15-20.
- Kalliomaki M.**, Isolauri E. (2003) Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 3: 15-20.
- Kalliomaki M.**, Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E. *Lancet* (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. 357: 1076-1079.

- Kampman E.**, Goldbohm R.A., van den Brandt P.A., van 't Veer P. (1994) Fermented dairy products, calcium, and colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Cancer Res.* 54: 3186-3190.
- Kato I.**, Endo-Tanaka K., Yokokura T. (1998) Suppressive effects of the oral administration of *Lactobacillus casei* on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Life Sciences* 63, 8: 635-644.
- Kato I.**, Yanaka K., Yokokura T. (1999) Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* 21: 121-131.
- Kiessling G.**, Schneider J., Jahreis G. (2002) Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56: 843-849.
- Klaasen L.H.**, (1993) *Infect. Immun.* 61: 303.
- Knasmüller S.**, Steinkellner H., Hirschl A.M., Rabot S., Nobis E.C., Kassie F. (2001) Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutat. Res.* 480: 129-138.
- Kosiewicz M.M.**, Alard P., Streilein J.W. (1998) Alterations in cytokine production following intraocular injection of soluble protein antigen: impairment in IFN-gamma and induction of TGF-beta and IL-4 production. *J. Immunol.* 161: 5382-5390.
- Kraehenbuhl J.P.**, Neutra M.R. (2000) Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 301-332.
- Krause I.**, Blank M., Shoenfeld Y. (2000) Immunomodulation of experimental autoimmune disease via oral tolerance. *Crit. Rev. Immunol.* 20: 1-16.
- Kruis W.**, Schutz E., Fric P., Fixa B., Judmaier G., Stolte M. (1997) Double-blind comparison of a oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11: 853-858.
- Kuhn R.**, Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Müller W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 75, 2:263-274.
- Kullberg M.C.**, Ward J.M., Gorelick P.L., Caspar P., Hieny S., Cheever A., Jankovic D., Sher A. (1998) *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12 and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect Immun.* 66, 11: 5157-5166.
- Laroia S.**, Martin J.H. (1990) Bifidobacteria as possible dietary adjuncts in cultured dairy products: A review. *Cult. Dairy Prod. J.* 25: 18-22.
- Lavegrove J.** Jackson K. Coronary heart disease. In: Mattila Sandholm T., Saarela M., eds. *Functional dairy products*. Cambridge, UK: Woodhill Publishing, 2003: 54-87.
- Levings M.K.**, Bacchetta R., Schulz U. And Roncarolo M.G. (2002) The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int. Arc. All. and Immunol.* 129 (4) .

- Lidbeck A.**, Nord C.E., Gustaffson J.A., Rafter J.J. (1991) Lactobacilli anticarcinogenic activities and human intestinal microflora. *Eur. J. Cancer Prevention* 1: 341-353.
- Lin Y.**, Shockett P., Stavnezer J. (1991) Regulation of the antibody class switch to IgA. *Immunol. Res.* 10: 376-380.
- Ling W.H.**, Korpela R., Mykkanen H., Salminen S., Hanninen O. (1994) *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J. Nutr.* 124: 18-23.
- Link-Amster H.**, Rochat F., Saudan K.Y., Mignot O., Aeschlimann J. M. (1994) Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flore mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10: 55-64.
- Lu L.**, Walker W.A. (2001) Pathologic and physiologic interaction of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 1124S-1130S.
- Lundin B.S.**, Karksson M.R., Svensson L.A., Hanson A., Dhalgren U.I.H., Telemo E. (1999) Active suppression in tolerized rats coincides with in situ transforming growth factor-beta (TGF- β) expression in the draining lymph nodes. *Clin. Exp. Immunol.* 116: 181-187.
- MacDonald T.T.** (1995) Breakdown of tolerance to the intestinal bacterial flora in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 102
- MacDonald T.T.** and Monteleone G. (2005) Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307: 1920-1925.
- Mack D.R.**, Michail S., Wei S., McDougall L., Hollingsworth M.A. (1999) Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* 276: G941-G950.
- Macpherson A.**, Khoo U.Y., Forgacs I., Philpott-Howard J., Bjarnason I. (1996) Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 38: 365-375.
- Madsen K.**, Doyle J., Jewell L.D., Tavernini M.M., Fedorak R.N. (1999) *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 116: 1107-1114.
- Majamaa H.**, Isolauri E. (1997) Probiotics: A novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 99: 179-185.
- Majamaa H.**, Isolauri E., Saxelin M., Vesikari T. (1995) Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 20: 333-338.
- Malin M.**, Suomalainen H., Saxelin M., Isolauri E. (1996) Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. *Ann. Nutr. Metab.* 40: 137-145.
- Mao Y.**, Nobaek S., Kasravi B. *et al.* (1996) The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 111: 334-344.
- Marth T.**, Strober W., Kelsall B.L. (1996) High dose oral tolerance in ovalbumin TCR-transgenic mice. Systemic neutralization of IL-12 augments TGF- β secretion and T cell apoptosis. *J. Immunol.* 157: 2348-2357.

- Marth T.**, Zeit M., Ludviksson B.R., Strober W., Kelsall B. (1999) Extinction of IL-12 signaling promotes Fas- mediated apoptosis of antigen specific T cell. *J. Immunol.* 162: 7233-7240.
- Matsuzaki T.**, Chin J. (2000) Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol.* 78(1): 67-73.
- Matsuzaki T.**, Yamazaki R., Hashimoto S., Yokokura T. (1998) The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J. Dairy Sci.* 81: 48-53.
- Mayer L.** (2000) Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30: S4-S12.
- Mayer L.** (2003) Mucosal immunity. *Pediatrics* 111: 1595-1600.
- McCarthy J.**, O'Mahony L., O'Callaghan L., Sheil B., Vaughan E.E, Fitzsimons N., Fitzgibbon J., O'Sullivan G.C., Kiely B., Collins J.K., Shanahan F. (2003) Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance *Gut* 52: 975-980.
- McDonough F.E.**, Hitchins A.D., Wong N.P., Wells P., Bodwell C.E. (1987) Modification of sweet acidophilus milk to improve utilization by lactose-intolerant persons. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 570-574.
- McGuirk P.**, Mills KH. (2002) Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol.* 23(9): 450-5.
- Medzhitov R.** and Janeway Jr. C. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173: 89-97.
- Mengheri E.**, Nobili F., Vignolini F., Pesenti M., Brandi G., Biavati B. (1999) *Bifidobacterium animalis* protects intestine from damage induced by zinc deficiency in rats. *J. Nutr.* 129: 2251-2257.
- Merson H.M.** Morris G.K., Sack D.A. (1976) Travellers diarrhoea in Mexico. *N. Engl. J. Med.* 294 1299-1304.
- Meyer O.** (2000) Oral immunomodulation therapy in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 67(5): 384-392.
- Miettinen M.**, Mtikainen S., Vuopio-Varkila J., Pirhonen J., Varkila K., Kurimoto M., Julkunen I. (1998) Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma-interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 66: 6058-6062.
- Min S.Y.**, Hwang S.Y., Park K.S., Lee J.S., Lee K.E., Kim K.W., Jung Y.O., Koh H.J., Do J.H., Kim H. and Kim H.Y. (2004) Induction of IL-10-producing CD4+CD25+ t cell in animal model of collagen-induced arthritis by oral administration of type II collagen. *Arthritis Res. Ther.* 6 (3): R213-219.
- Mosmann T.**, Coffman R. (1989) TH1 and TH2: different pattern of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* vol.7: 145-173.
- Mowat A.M.** (1994) Oral tolerance and regulation of immunity to dietary antigens. In: *Handbook of mucosal immunology* (Ogra P., Mestecky J., Lamm M., Strober W., Bienenstock J., McGhee J., eds), 587-618, Academic Press.

- Okada H**, Konishi K, Nakazato Y, Kanno Y, Suzuki H, Sakaguchi H, Saruta T (1994) Interleukin-4 expression in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 23(2):242-246.
- O'Leary A.D.**, Sweeney E.C. (1986) Lymphoglandular complex of the colon: structure and distribution. *Histopath.* 10: 267-280.
- Ouwehand A.C.**, Isolauri E., Salminen S. (2002) The role of intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur. J. Nutr.* 41: I32-I37.
- Pelto L.**, Isolauri E., Lilius E.M., Nuutila J., Salminen S. (1998) Probiotic bacteria downregulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy* 28: 1474-1479.
- Perdigon G.**, Alvarez S. (1992) Probiotic and the immune state. In: Probiotic p.145. R. Fuller, ed. Chapman and Hall Sci. Ltd., London, England.
- Perdigon G.**, Alvarez S., Pesce D.R.H. (1991) Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *J. Dairy Res.* 58 485-496.
- Perdigon G.**, Alvarez S., Rachid M., Agüero G., Gobbato N. (1995) Symposium: probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness. Immune System Stimulation by Probiotics. *J. Dairy Sci.* 78: 1597-1606.
- Perdigon G.**, De Macias M.E., Alvarez S., Oliver G., De Ruiz H. (1988) Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 63: 17-23.
- Perdigon G.**, Vintini E., Alvarez S., Medina M., Medici M. (1999) Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 82: 1108-1114.
- Pessi T.**, Sutas J., Hurme M., Isolauri E. (2000) Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clinical and Experimental Allergy* 30: 1804-1808.
- Pessi T.**, Sutas J., Saxelin M., Kallioinen H., Isolauri E. (1999) Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. *Appl. Environ. Microb.* 65: 4725-4728.
- Peters R.K.**, Pike M.C., Garabrant D., Mack T.M. (1992) Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. *Cancer Causes Control* 3: 457-473.
- Rafaeli Y.**, Van Puijs L., London C.A., Tschopp J., Abbas A.K. (1998) Biochemical mechanism of IL-2 regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8: 615-623.
- Rafter J.** (2003) Probiotics and colon cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17: 849-859.
- Rakoff-Nahoum S.**, Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S. and Mendzhitov R. (2004) Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118: 229-241.
- Ramsay A.J.**, Husband A.J., Ramshaw I.A., Bao S., Matthei K.I., Koehler G., Kopf M. (1994) The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science.* 264 (5158): 561-563.

- Rautava S.**, Ruuskanen O., Ouwehand A., Salminen S., Isolauri E. (2004). The hygiene hypothesis of atopic disease-an extended version. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 38: 378-388.
- Rembacken B.J.**, Snelling A.M., Hawkey P.M., Chalmers D.M., Axon A.T. (1999) Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomized trial. *Lancet* 354: 635-639.
- Rolfe R.D.** (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130: 396S-402S.
- Roncarolo M.G.**, Bacchetta R., Bordinon C., Narula S. and Levings M.K. (2001) Type 1 T regulatory cells. *Immunological Reviews* 182: 68-79.
- Rook G.A.W.** and Brunet L.R. (2005) Microbes, immunoregulation and the gut. *Gut* 54: 317-320.
- Rosenfeldt V.**, Benfeldt E., Nielsen S.D., Michaelsen K.F., Jeppesen D.L., Valerius N.H., Paerregaard A. (2003) Effect of probiotics *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 390-395.
- Saavedra J.M.**, Bauman N.A., Oung I., Perman J.A., Yolken R.H. (1994) Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 344: 1046-1049.
- Saikali J.**, Picard C., Freitas M., Holt P. (2004) Fermented milks, probiotic cultures, and colon cancer. *Nutr. Cancer* 49: 14-24.
- Salminen S.** Bouley M.C., Boutron-Ruault M.C. et al. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutrition* 80: 147-171.
- Salminen S.**, Isolauri E., Salminen E. (1996) Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenge. *Ant. Leeuwenhoek.* 70: 347-358.
- Sanders M. E.** (1993) Effect of consumption of lactic cultures on human health. In: *Adv. Food and Nutrition Res* (Kinsella, J.E, ed.), Vol 37, pp 67-130. Academic Press, New York.
- Schiffrin E.J.**, Brassart D., Servin A.L., Rochat F., Donnet-Huges A. (1997) Immunomodulation of blood leukocytes in humans by lactoc acid bacteria: criteria for strain selection. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 515S-520S.
- Schiffrin E.J.**, Rochat F., Link-Amstern H., Aeschlimann J.M., Donnet-Hughes A. (1995) Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 78: 491-497.
- Schultz M.**, Veltkamp C., Dieleman L.A., Grenther W.B., Wyrick P.B., Tonkonogy S.L., Sartor R.B. (2002) *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm. Bow. Dis.* 8: 71-80.
- Shanahan F.** (2002) Crohn's disease. *Lancet* 359: 62-69.
- Shanahan F.** (2004) Probiotics in inflammatory bowel disease--therapeutic rationale and role. *Adv Drug Deliv Rev.* 19;56(6):809-18.
- Siitonen S.** Vapaatalo H., Salminen S. (1990) Effect of *Lactobacillus GG* yogurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann. Med.* 22: 57-59.

- Simecka J. W.** (1998) Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. *Advanced Drug Delivery Reviews* 34: 235-259.
- Solis-Pereyra B.**, Aattouri N., Lemonnier D. (1997) Role of food in the stimulation of cytokine production. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 521S-525S.
- Steidler L.**, Hans W., Schotte L., Neirynck S., Obermeier F., Falk W., Fiers W., Remaut E. (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289, 5483: 1352-1355.
- Strobel S.**, Mowat A.M. (1998) Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today* 19: 1743-181.
- Sudo N.**, Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C., Koga Y. (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunology.* 159: 1739-1745.
- Szajewska H.**, Mrukowicz J.Z. (2001) Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 33: S17-S25.
- Tagliabue A.**, Villa L., De Magistris L.T., Romano M., Silvestri S., Boraschi D., Nencioni L. (1986) IgA driver T cell-mediated antibacterial immunity in man after live oral Ty21a vaccine. *J. Immunol.* 137: 1504-1510.
- Taranto M.P.**, Medici M., Perdigon G., Ruiz Holgado A.P., Valdez G.F. (2000) Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *J. Dairy Sci.* 83: 401-403.
- Tejada-Simon M.V.**, Lee J.H., Ustunol Z., Pesta J. J. (1999) Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate Immunoglobulin A response to cholera toxin in mice. *J. Dairy Sci.* 82: 649-660.
- Tsuiji N. M.**, Mizumachi K., Kurisaki J. (2001) Interleukin-10-secreting Peyers patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology* 103, 4.
- Ulisse S.**, Gionchetti P., D'Alo S., Russo F.P., Pesce I., Ricci G., Rizzello F., Helwig U., Cifone M.G., Campieri M., De Simone C. (2001) Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. *Am J Gastroenterol.* 96,9: 2691-2699.
- Umesaki Y.**, Okada Y., Matsumoto S., Imaoka A. and Setoyama H. (1995) Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. *Microbiol. Immunol.* 39:555.
- Van Niel C.W.**, Feudtner C., Garrison M.M., Christakis D.A. (2002) *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 109: 678-684.
- Venturi A.**, Gionchetti P., Rizzello F., Johansson R., Zucconi E., Brigidi P., Matteuzzi D., Campieri M. (1999) Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13: 1103-1108.

- Von der Weid T.**, Bulliard C., Schiffrin E.J. (2001) Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4⁺ cells with low proliferative capacity that produce Transforming Growth Factor β and Interleukin-10. Clin. Diagnostic Laborat. Immunol. 8: 695-701.
- Walker W.**, Duffy, L.C. (1998) Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. J. Nutr. Biochem. 9: 668-675.
- Wang MF**, Lin HC, Wang YY, Hsu CH. (2004) Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. Pediatr. Allergy Immunol. 15(2): 152-158.
- Weiner H. L** (1997) Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. Annu Rev Med. 48: 341-351.
- Weiner H. L.** (2001) Induction and mechanisms of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. Immunol. Rev. 182: 207-214.
- Weiner H.L.** (2001) Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. Microbes and infection 3: 947-954.
- Weiner H.L.** (2001) The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and Tr1 and Th3 regulatory cells. Nat. Immunol. 8: 671-672.
- Whittrac C.C.**, Gienapp I.E., Orosz C.G., Bitar D.M. (1991) Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for clonal anergy. J. Immunol. 147: 2155-2160.
- Wildbaum G.**, Netzer N. and Karin N. (2002) Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effects of determinant spreading. J.Clin. Invest. 110: 701-710.
- Zhang X.**, Izikson L., Liu L. and Weiner H.L. (2001) Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. J.Immunol. 167 (8): 4245-4253.