



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO**

**FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE BIOSANITARIE**

**TESI SPERIMENTALE
IN FISILOGIA GENERALE**

**Effetti dell'esposizione topica a
Lactobacillus paracasei L20
sui parametri funzionali di colon umano**

RELATORI

Prof. Lucantonio Debellis

Dr.ssa Palmira De Bellis

LAUREANDA:

Comasia Colucci

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

SOMMARIO

1. OBIETTIVO DELLA TESI	3
2. RAZIONALE	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
2. 1. NUTRIZIONE COME SINONIMO DI SALUTE	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
2. 2. GLI ALIMENTI FUNZIONALI	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
2. 3. MICROFLORA INTESTINALE.....	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
2. 4. I BATTERI LATTICI: CARATTERISTICHE GENERALI.....	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
2. 5. LATTOBACILLI E LORO EFFETTI “PROBIOTICI” A LIVELLO INTESTINALE....	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
2. 5. 1. <i>Degradazione e sintesi di carboidrati</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 5. 2. <i>Degradazione di fattori antinutrizionali</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 5. 3. <i>Assorbimento dei minerali</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 5. 4. <i>Sintesi delle vitamine</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 5. 5. <i>Effetti dei lattobacilli nella condizione di sovrappeso</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 6. LATTOBACILLI E PREVENZIONE DELLE MALATTIE	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
2. 6. 1. <i>Potenziale applicazione nei carcinomi ?</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 6. 2. <i>Potenziali effetti benefici nelle patologie cardiovascolari</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 6. 3. <i>Effetti nelle infiammazioni intestinali</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 6. 4. <i>Azione antidolorifica</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 7. LATTOBACILLI E IMMUNOMODULAZIONE.....	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
2. 7. 1. <i>Le allergie</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 7. 2. <i>L’immuno-modulazione e Adesione</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 8. LATTOBACILLI E PROTEZIONE CONTRO I PATOGENI.....	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
2. 8. 1. <i>Miglioramento della barriera intestinale</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 8. 2. <i>Competizione con i patogeni</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 8. 3. <i>Proprietà antifungine</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 8. 4. <i>Proprietà antivirali</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 8. 5. <i>Proprietà antibatteriche</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
2. 9. IL COLON	4
2. 9. 1. <i>Neurologia e motilità del colon</i>	25
2. 9. 2. <i>Funzione intestinale di assorbimento e secrezione</i>	27
3. MATERIALI E METODI	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
3.1. PREPARAZIONE DELLE COLTURE BATTERICHE.....	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
3. 1.1. <i>CEPPO batterico</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
3. 1.2. <i>Substrati di crescita</i>	39
3. 1.3. <i>Soluzione salina di Krebs</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
3. 1.3. <i>Sospensioni batteriche di L. paracasei L20</i>	Errore. Il segnalibro non è definito.
3. 2. MISURE BIOELETTRICHE IN CAMERA DI USSING.....	39
3. 2. 1. <i>Reperimento dei campioni di colon</i>	43
3. 2. 2. <i>Misure bioelettriche</i>	44
3. 2. 3. <i>La camera di Ussing</i>	45
3. 2. 4. <i>Allestimento del preparato</i>	50
3. 2. 5. <i>Sistema e procedure di misura</i>	52
3.3. ANALISI STATISTICA	55
4. RISULTATI	58
4.1. VALORI BASALI DEI DEI PARAMETRI FUNZIONALI	58
4.2. EFFETTO DELL’ESPOSIZIONE A SOSPENSIONI BATTERICHE	59
5. CONCLUSIONI	70
5. BIBLIOGRAFIA.....	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.

1. OBIETTIVO DELLA TESI

Il corpo umano possiede nicchie ecologiche, capaci di ospitare un numero enorme di microrganismi, tra i quali i batteri che compongono la microflora del tratto gastrointestinale. Tali batteri svolgono un ruolo di notevole importanza per la salute dell'organismo umano ed hanno pertanto ricevuto notevole attenzione anche per il loro possibile coinvolgimento in malattie infiammatorie dell'intestino.

Le interazioni tra le diverse componenti della microflora intestinale e l'organismo umano sono molto complesse e sebbene alcuni aspetti siano stati studiati e almeno in parte chiariti altri sono ancora sconosciuti. In particolare, non sono noti gli effetti dei batteri sui meccanismi che regolano e determinano il trasporto ionico attraverso la mucosa intestinale e la sua permeabilità. Questo lavoro di tesi riguarda appunto lo studio di questo aspetto.

Tra le migliaia di specie batteriche presenti nella flora intestinale, un'attenzione particolare è stata rivolta ai batteri lattici che possono svolgere un ruolo benefico sull'intestino. Infatti, per questo motivo, ad alcuni di essi è stato assegnato l'appellativo di "probiotici". I batteri probiotici sono definiti come microrganismi viventi che, quando somministrati in quantità adeguata, conferiscono un beneficio alla salute dell'uomo (FAO/WHO Health, 2008).

La presente tesi ha come scopo quello di valutare gli effetti del ceppo probiotico *Lactobacillus paracasei* L20 sui meccanismi di trasporto ionico e di permeabilità della mucosa del colon umano. Questi studi sono stati effettuati utilizzando un modello *in vitro*, che permette di avvicinarsi il più possibile alle condizioni fisiologiche che si realizzano *in vivo*. Il modello utilizzato, rappresentato dalla mucosa intestinale di colon umano è stato utilizzato con il dispositivo sperimentale definito "camera di Ussing", mediante il quale è possibile riprodurre su campioni di tessuto isolato le condizioni normali di funzionamento e condurre sperimentazioni specifiche. Utilizzando questo modello sono state valutate, in condizioni controllate, le variazioni di trasporto ionico e di permeabilità della mucosa intestinale umana determinate dall'esposizione a diverse concentrazioni di batteri lattici.

Gli esperimenti sono stati condotti presso i laboratori dell'ISPA CNR di Bari e del Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Scienze Farmacologiche dell'Università di Bari, con la collaborazione dei chirurghi Dott. Luigi Scopetta, Prof. Donato F. Altomare, Prof. Caputi e Dott. De Fazio delle unità di Chirurgia del Policlinico di Bari che sono stati disponibili a fornire i campioni di colon umano.

2. RAZIONALE

2. 1. Nutrizione come sinonimo di salute

La nutrizione è quel processo fisiologico mediante il quale tutti gli organismi traggono dall'ambiente in cui vivono l'energia e i principi nutritivi necessari per mantenersi in vita, crescere e riprodursi.

Naturalmente alla base della nutrizione ci sono gli alimenti, che sono classificati in base ai principi nutritivi che contengono.

Bisogna fare prima di tutto una distinzione tra nutrizione e alimentazione: l'alimentazione è definita come apporto di alimenti, mentre la nutrizione è definita come l'utilizzazione dei principi nutritivi che essi contengono e apportano.

Alimentarsi è un atto complesso regolato da meccanismi non solo fisiologici ma anche psicologici.

Nel corso della storia il concetto di nutrizione si è evoluto come tutto il resto; infatti, all'inizio l'uomo ha subito la sua alimentazione, nel senso che doveva accontentarsi dei prodotti della caccia e della pesca o di quelli spontanei. Poi ha iniziato a coltivare, ad allevare e produrre, quindi è riuscito a elaborare un'alimentazione sempre più abbondante e qualificata sotto il profilo nutrizionale. (Cabras & Martelli, 2004)

Con il passare del tempo, l'uomo ha capito che una sana alimentazione è il principio di uno stato di salute ottimale. La parola "dieta" sta, infatti, a significare "modo di vivere" che si attribuisce non solo alla dieta alimentare, ma anche a un corretto stile di vita.

Ai giorni nostri è risaputo che la dieta "*Mediterranea*" è quella che meglio promuove lo stato di salute di un individuo, non per altro da qualche anno la dieta mediterranea è entrata a far parte del patrimonio dell'UNESCO.

Il primo scienziato che ha avuto queste intuizioni riguardo la dieta Mediterranea è stato l'americano Angel Keys(1904-2004), il quale notò che nei paesi dell'area Mediterranea, in particolar modo in Italia e nell'isola di Creta, vi era una bassa incidenza di patologie coronariche, nonostante un elevato consumo di olio di oliva.

Keys iniziò ad approfondire i suoi studi a partire dagli anni cinquanta, partendo da ricerche epidemiologiche, mettendo a confronto i regimi alimentari di circa 1200 persone di età compresa tra i 40 e 59 anni, sparse in sette Paesi del mondo (Italia, Finlandia, Giappone, Grecia, Olanda, Jugoslavia e Stati Uniti). Con questa ricerca, definita "*Seven Countries Study*", e con indagini successive Keys mostrò come malattie tumorali del tratto gastrointestinali, cardiovascolari e aterosclerosi avessero una minor incidenza nell'area mediterranea. In questi Paesi, infatti, la mortalità per infarto è inferiore rispetto ad altri Paesi, dove

prevale una dieta ricca di grassi saturi (strutto, latte e derivati, carni rosse, burro ecc.). Keys arrivò alla conclusione che tutto ciò era dovuto al tipo di alimentazione tipico di queste zone geografiche e definì la dieta Mediterranea come stile di vita in cui “*to eat well and stay well*” (Keys & Keys, 1975).

I benefici dell'alimentazione mediterranea furono confermati da successivi studi effettuati negli anni settanta.

Lo stesso Keys si stabilì in Campania dove visse fino a cento anni.

In conclusione, perché si mantenga un buono stato di salute, la dieta deve essere *quantitativamente adeguata, nutrizionalmente completa*, deve quindi contenere tutti i gruppi alimentari, *equilibrata, variata*, ossia deve vedere ruotare gli alimenti nell'arco della settimana, *inserita in uno stile di vita sano*, evitando la sedentarietà, lo stress e le abitudini dannose come ad esempio fumo ed alcol.

Una dieta equilibrata rispecchia le proporzioni illustrate visivamente nella piramide alimentare: alla sua base, ancor prima degli alimenti, è collocata l'attività fisica quotidiana; giornalmente sono raccomandati cibi ricchi di carboidrati complessi (pane, pasta, riso, patate), frutta, verdura e frutta secca, raccomandati in dose maggiore rispetto all'olio di oliva, seguito da formaggi e yogurt; con cadenza settimanale vanno consumati, in dosi via via più basse, pesce, carni bianche, uova e i dolci; con cadenza mensile le carni rosse (Hu, 2003). (Figura 1).

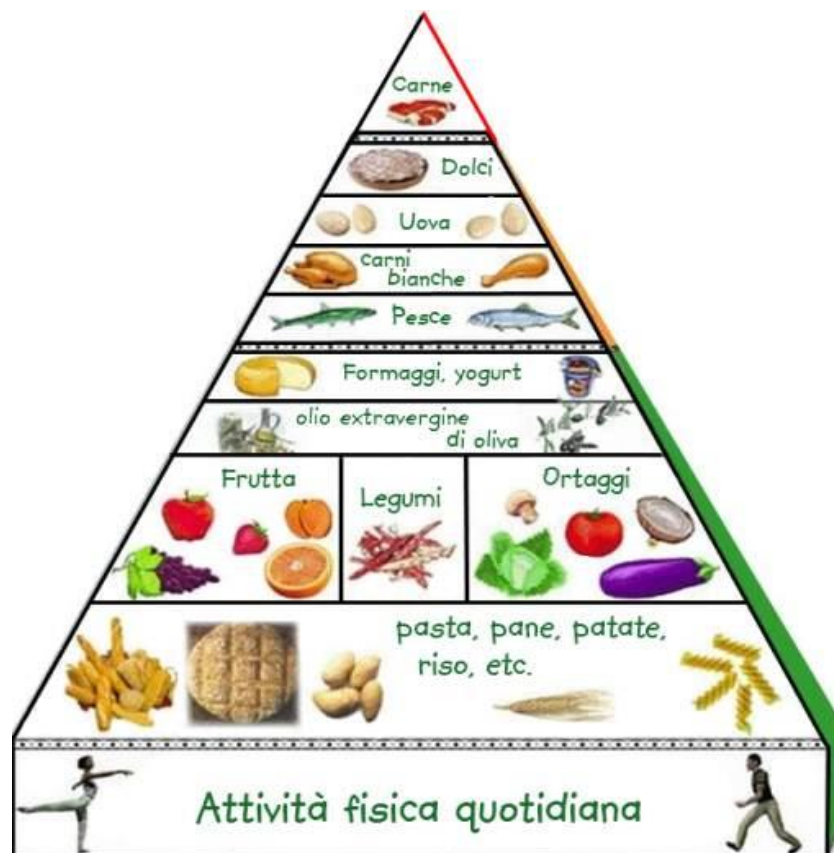


Figura 1. Piramide alimentare.

2. 2. Gli alimenti funzionali

L'impegno prioritario di studiosi ed operatori nel settore dell'alimentazione è certamente rivolto alla definizione e diffusione di corrette linee guida alimentari, allo scopo di limitare ed affrontare i gravi rischi per la salute connessi alle deviazioni da sane abitudini alimentari e allo stile di vita nei Paesi ad economia avanzata.

La tecnologia e l'industria alimentare possono collaborare a questo scopo, fornendo nuovi prodotti che, senza snaturare le caratteristiche organolettiche dell'alimento tradizionale, possano contribuire a ripristinare gli equilibri nutrizionali alterati da associazioni alimentari squilibrate.

Quindi a partire da qualche anno, industrie alimentari e farmaceutiche, grazie a nuove conoscenze in materia di nutrizione e all'applicazione di nuove tecnologie sono riuscite a produrre degli alimenti definiti "*nutraceutici*" o "*funzionali*".

Questi alimenti hanno degli effetti positivi sullo stato di salute dell'individuo, dovuti ai composti in essi presenti.

Queste sostanze che vengono aggiunte agli alimenti funzionali sono presenti negli alimenti a basse concentrazioni e non sono riconducibili agli elementi nutritivi primari quali carboidrati, proteine, lipidi e sali minerali. (Cozzani & Dainese, 2006).

Il termine "nutraceutico" è stato introdotto nel 1989 dalla "Fondazione USA per l'Innovazione Medica" per indicare qualunque sostanza, presente in un alimento o parte dell'alimento stesso, capace di apportare benefici alla salute, prevenire o trattare patologie. (Stephen & DeFelice, 1995).

Questi nuovi prodotti, si stanno diffondendo nei Paesi industrializzati di tutto il mondo, ma c'è da dire che se l'assunzione di tali alimenti non è accompagnata da una buona conoscenza delle regole alimentari e dietetiche, essi rischiano di diventare privi di benefici pratici, se non addirittura apportatori di ulteriori squilibri e carenze. (Cozzani & Dainese, 2006).

Gli "alimenti funzionali" comprendono alcune classi di alimenti o di ingredienti alimentari che, oltre alle proprietà nutrizionali convenzionali, legate ai nutrienti primari in essi contenuti, possiedono effetti salutistici addizionali. Sono consumati comunemente con la dieta ed efficaci già alle quantità che vengono introdotte normalmente. Possono prevenire le malattie, agire sullo sviluppo dell'organismo e promuoverne lo stato di salute, poiché presentano componenti che, mediante l'interazione con alcune funzioni fisiologiche dell'organismo, le influenzano positivamente (biomodulazione). Questi alimenti possono essere utili a tutta la popolazione per integrare un'alimentazione a rischio di carenze (Caragay, 1992; Thomas & Earl, 1994).

Per definizione "un alimento può essere considerato funzionale se si è dimostrata la sua influenza benefica sull'organismo, al di là di adeguati effetti nutrizionali, in modo più che rilevante sul miglioramento della salute, del

benessere e/o riduzione di rischio di malattia”. Un alimento funzionale deve restare alimento e mostrare i suoi effetti in quantità che possono essere normalmente consumate in una dieta. Non è una pillola o una capsula, ma parte di un modello alimentare normale” (Diplock et al., 1999).

L'azione positiva degli alimenti funzionali è dovuta al loro contenuto in vitamine (per favorire sviluppo e mantenimento dell'organismo), in antiossidanti (per ridurre i danni cellulari prodotti dai radicali liberi, i responsabili dei processi di invecchiamento e insorgenza di patologie come quelle tumorali), prebiotici e probiotici (per favorire lo sviluppo della flora batterica intestinale, che garantisce il funzionamento del sistema digerente e ostacola lo sviluppo di batteri patogeni).

2. 3. Microflora intestinale

La flora intestinale è scientificamente definita come “un insieme di microrganismi presenti nel lume intestinale i quali, se convivono in un determinato equilibrio, contribuiscono allo stato di salute dell'ospite”.

La microflora comincia a svilupparsi nel neonato non appena viene a contatto con i microbi provenienti dal tratto genitourinario della madre. I microrganismi, inizialmente lattobacilli e streptococchi, compaiono nelle feci già dai primi giorni di vita.

Progressivamente si sviluppa un complesso ecosistema costituito da diverse specie di microrganismi aerobi ed anaerobi, la cui concentrazione massima viene raggiunta entro i primi quattro anni di vita e permane fino all'età adulta.

La flora intestinale è un buon esempio di mutualismo: cooperazione tra differenti tipologie di organismi che apporta un vantaggio ad ognuna. Specifiche comunità di questi microrganismi sono presenti nello stomaco, nei vari tratti dell'intestino tenue e nei vari tratti del colon (Tannock, 1995); naturalmente le concentrazioni variano a seconda del tratto che colonizzano.

Le varie specie microbiche intestinali sono state inizialmente identificate dopo coltivazione su opportuni terreni di coltura (Tannock, 1999). Solo successivamente, con lo sviluppo di metodologie molecolari è stato possibile rilevare che la diversità della flora intestinale era stata notevolmente sottovalutata (Frank & Pace 2008). Infatti, l'identificazione dei batteri presenti nell'intestino dei mammiferi può essere più efficacemente ottenuta con metodi non dipendenti dalla coltivazione e basati sull'amplificazione e sequenziamento del gene del 16S RNA.

Molti studi hanno dimostrato che i microrganismi presenti nel tratto gastrointestinale, hanno influenze considerevoli a livello biochimico, fisiologico, immunologico e rendono l'intestino resistente a vari tipi di infezioni intestinali (Berg, 1996; Gordon & Pesti, 1971).

Per poter colonizzare l'intestino i microrganismi devono avere due proprietà importanti: capacità di aderenza e di sopravvivenza. Avendo poi ciascuno un diverso metabolismo, la convivenza tra essi è possibile grazie al controllo che ciascuna specie esercita sullo sviluppo dell'altra. Soltanto quei batteri che riescono ad adattarsi all'ambiente possono attuare la colonizzazione utilizzando il materiale nutritivo disponibile per la loro sopravvivenza e moltiplicazione.

Vari fattori influenzano la microflora: l'età, la dieta, le infezioni, l'uso dei farmaci. La regolarità intestinale costituisce un'utile barriera all'eccessiva proliferazione delle specie batteriche, mentre una situazione di stasi può portare a modificazioni nel numero e nella qualità dei batteri.

2. 4. I Batteri Lattici: caratteristiche generali

I batteri lattici (LAB) rappresentano, insieme ai lieviti, i microrganismi con il maggior numero di applicazioni nella preparazione degli alimenti. I LAB sono stati descritti per la prima volta come elementi di acidificazione del latte, in quanto causano tale alterazione per effetto della produzione di acido lattico.

Sono batteri Gram-positivi, cocchi o bacilli, non sporigeni, catalasi negativi e sprovvisti di citocromi, dalle abitudini anaerobiche ma aerotolleranti, che normalmente generano acido lattico come principale prodotto metabolico della fermentazione dei carboidrati (Axelsson, 2004). Storicamente il gruppo comprende i generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, ma tra i generi di LAB di maggiore importanza nelle tecnologie alimentari, vi sono anche *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (Axelsson, 2004; Stiles & Holzapfel, 1997).

I LAB possono essere distinti in omo- o etero-fermentanti, a seconda del modo in cui fermentano gli zuccheri esosi in condizioni di crescita non limitanti. I LAB omo-fermentanti utilizzano la via della glicolisi (ciclo di Embden-Meyerhof-Parnas), che genera acido lattico come prodotto finale principale. I LAB etero-fermentanti utilizzano invece la via della 6-fosfogluconato/fosfochetolasi (6-PG/PK), che porta principalmente alla produzione di acido lattico, anidride carbonica ed etanolo (o acido acetico) come prodotti finali. Tuttavia, i LAB omo- e etero-fermentanti non possono essere distinti esclusivamente in base al tipo di prodotti di fermentazione che generano, poiché alcune specie si comportano come etero-fermentanti facoltative che in particolari condizioni (ad esempio, se la fonte di carbonio disponibile è un pentoso) attivano la via metabolica 6-PG-PK, con conseguente fermentazione eterolattica (Axelsson, 2004).

I LAB hanno complesse esigenze nutritive soprattutto per quanto riguarda i carboidrati fermentescibili, aminoacidi, acidi grassi, sali e vitamine (Bjorkroth e Holzapfel, 2006; Hammes & Hertel, 2003) e producono numerosi metaboliti, oltre all'acido lattico e acetico, che influenzano positivamente l'aroma ed il

sapore degli alimenti fermentati, come il diacetile che proviene dal metabolismo del citrato.

2. 5. Lattobacilli e loro effetti “Probiotici” a livello intestinale

La FAO (*The Food and Agriculture Organization*) e la WHO (*World Health Organization*) definiscono come probiotici quei “microrganismi, che somministrati in dosi adeguate, conferiscono all’ospite vari benefici per la salute” (FAO/WHO, 2001)

Per alimenti “probiotici” si intendono quegli alimenti che contengono, in numero sufficientemente elevato, microrganismi probiotici vivi ed attivi in grado di raggiungere l’intestino.

Si tratta quindi di alimenti in grado di promuovere e migliorare le funzioni di equilibrio fisiologico dell’organismo, attraverso un insieme di effetti aggiuntivi rispetto alle normali attività nutrizionali.

Le specie batteriche maggiormente utilizzate per la produzione di alimenti probiotici appartengono ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. (Felis & Dellaglio, 2007; Kleerebezem & Vaughan, 2009).

Batteri del genere *Lactobacillus*, in particolare, si possono trovare in molti alimenti come: latte, formaggi e cereali fermentati o alimenti di origine vegetale. Inoltre essi sono presenti nella cavità orale, nel tratto gastrointestinale (GIT), nelle vagine umane ed animali (Hammes & Vogel, 1995), dove, in relazione alle differenti condizioni chimico-fisiche, si sviluppano specifiche comunità di microrganismi.

Un aspetto che riveste notevole importanza per la produzione di alimenti probiotici è la capacità della carica batterica probiotica di sopravvivere al confezionamento e rimanere vitale in quantità sufficientemente elevata fino al momento del consumo.

La sopravvivenza di tali batteri ai processi tecnologici, dalla fase di formulazione, preparazione e conservazione fino allo stoccaggio, costituisce, di fatto, un fattore limitante per la realizzazione di prodotti probiotici (Cabras & Martelli, 2004).

Sebbene gli studi riguardanti i batteri lattici e le loro proprietà probiotiche siano ormai numerosi, i meccanismi d’azione tramite i quali i batteri probiotici esercitano effetti benefici sull’ospite non sono ancora completamente compresi. Generalmente si ritiene che tali meccanismi possano essere inquadrati nelle seguenti categorie talvolta in parte sovrapposte: a) inibizione di microrganismi patogeni e capacità di ripristinare l’equilibrio microbico; b) modulazione della risposta immunitaria e c) capacità di migliorare l’effetto barriera dell’epitelio intestinale. Inoltre si ritiene che i batteri probiotici possano esercitare la loro azione benefica intervenendo in aspetti che sono essenzialmente di tipo

nutrizionale. Di seguito, sono riportate nello specifico le diverse funzioni benefiche che i batteri probiotici possono esercitare a vantaggio dell'ospite.

2. 5. 1. Degradazione e sintesi di carboidrati

E' stato dimostrato, che uno degli effetti più noti dei batteri lattici è la capacità di degradare i carboidrati, tra i quali il lattosio, riducendo così i problemi intestinali associati all'intolleranza al lattosio e alla sua cattiva digestione (de Vrese et al., 2001).

Analogamente al lattosio, gli α -galattosidi, come il raffinose possono causare fermentazione nel tratto digestivo, determinando una eccessiva produzione di gas e dolori addominali (Cristfaro et al., 1974).

In diversi ceppi di batteri lattici appartenenti alle specie *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. plantarum*, è stata osservata un'attività α -galattosidasica. (Donkor et al., 2007; Songre-Ouattara et al., 2008).

Inoltre, alcuni lattobacilli hanno la capacità di produrre inulina, un polimero del fruttosio, che determina effetti benefici, anche se non può essere digerita dagli uomini. Infatti, l'inulina promuove la crescita dei bifidobatteri nell'intestino umano (Gibson et al., 1995), e migliora l'assorbimento del calcio e del magnesio.

2. 5. 2. Degradazione di fattori antinutrizionali

Alcuni lattobacilli sono capaci di degradare i tannini e il fitato, considerati fattori antinutrizionali, perché in grado di chelare gli ioni metallici e ridurre la biodisponibilità. Si può quindi ipotizzare, che la degradazione di queste sostanze, aumenti la biodisponibilità dei minerali. La capacità di degradazione dei tannini è frequentemente associata alla fermentazione di materiali vegetali e può conferire un vantaggio ecologico per i lattobacilli poiché i tannini esercitano un effetto inibitorio sulla crescita di tali batteri. (Osawa et al., 2000).

2. 5. 3. Assorbimento dei minerali

Anche se la carenza di cloruro è rara, essa può verificarsi a causa di una grave diarrea o di vomito, con conseguente bassa pressione sanguigna e una sensazione generale di debolezza (Grossman et al., 1980).

Alcune ricerche hanno mostrato che ceppi batterici appartenenti alle specie *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* incrementano l'attività dello scambiatore anionico Cl^-/OH^- in cellule Caco-2 e quindi anche l'assorbimento del cloruro (Borthakur et al., 2008). Altri ceppi batterici hanno mostrato la capacità d'incrementare l'assorbimento del calcio da parte di cellule Caco-2 e potrebbero pertanto esercitare un effetto positivo nella prevenzione di malattie quali l'osteoporosi (Gilman & Cashman, 2006).

2. 5. 4. Sintesi delle vitamine

Le vitamine idrosolubili del gruppo B sono dei nutrienti essenziali ed hanno un ruolo importante nel metabolismo cellulare dell'uomo.

Tra i gruppi di batteri in grado di produrre vitamine del gruppo B, i batteri lattici sono di notevole importanza (Burgess et al., 2009:). Infatti alcuni di essi possono produrre folato, la vitamina B2 o la vitamina B12 e quindi il consumo di batteri probiotici potrebbe essere un utile ausilio terapeutico nei casi di carenza vitaminica.

2. 5. 5. Effetti dei lattobacilli nella condizione di sovrappeso

Concentrazioni più elevate di lattobacilli sono state riscontrate in pazienti obesi rispetto ai controlli magri o anoressici (Armougom et al., 2009). Al contrario, si è constatato che alcune specie di lattobacilli possono influenzare il metabolismo energetico umano e di ratto ed esercitare un'attività anti-obesità, mediante i loro acidi linoleici coniugati (Riserus et al., 2003; Ryder et al. 2001:), che possono determinare un incremento della lipolisi (Park et al., 1999). Pertanto i dati disponibili su questo argomento risultano ancora contrastanti, e ulteriori studi sarebbero necessari per valutare l'opportunità dell'uso dei batteri lattici nella dieta di persone in sovrappeso.

2. 6. Lattobacilli e prevenzione delle malattie

Sebbene ulteriori studi sarebbero necessari per stabilire una relazione chiara tra attività dei lattobacilli nell'intestino e prevenzione delle malattie, nei paragrafi successivi, saranno menzionati alcuni potenziali effetti benefici dei lattobacilli nel ridurre gli effetti genotossici di carcinogeni introdotti con la dieta, nella prevenzione delle patologie cardiovascolari, nelle patologie infiammatorie e in altre malattie.

2. 6. 1. potenziale applicazione nei carcinomi ?

La carcinogenesi è un processo multifattoriale che è influenzato dall'eredità genetica, dai fattori ambientali e dalle mutazioni spontanee; essa è definita come il processo mediante il quale le cellule normali possono degenerare e può essere almeno in parte causata dall'azione degli xenobiotici (Weisburger, 1985).

Alcuni studi suggeriscono che determinati lattobacilli possono esercitare effetti protettivi che ostacolano lo sviluppo di alcune fasi della cancerogenesi (fig. 2) Alcuni lattobacilli possono modulare l'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici. Ad esempio *L. fermentum* 15007 ha mostrato la capacità d'incrementare, nelle cellule Caco-2, i livelli della glutatione - S - trasferasi che svolge un'azione detossificante (Yang et al., 2007). Tuttavia i batteri della

microflora intestinale, mediante la loro attività β -glucuronidasica, possono anche contrastare l'azione delle trasferasi detossificanti endogene, ritossificando alcune sostanze xenobiotiche (Goldin and Gorbach, 1984). E' stato osservato che la somministrazione di lattobacilli probiotici può determinare una sensibile riduzione dell'attività β -glucuronidasica fecale, effetto questo attribuito a variazione del pH intestinale o della composizione della microflora.

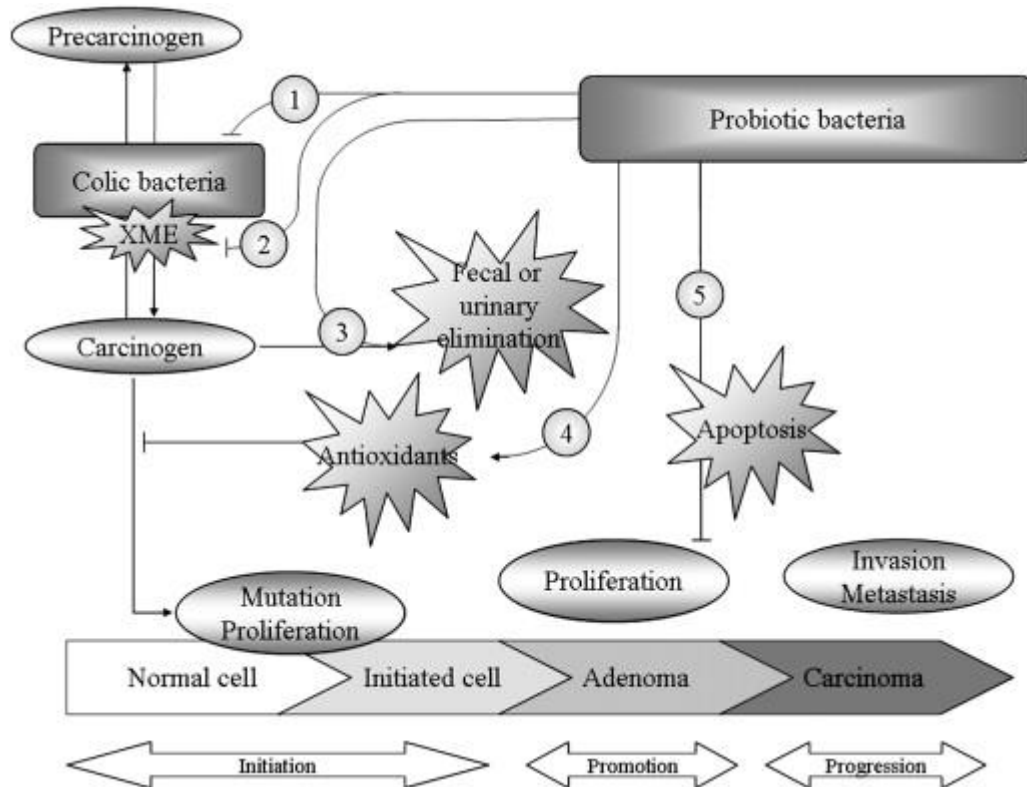


Figura 2. Carcinogenesi e azione dei probiotici: inibizione dell'attività enzimatica dei batteri presenti nel colon (1), modulazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici (XME) (2), aumento dell'eliminazione di composti cancerogeni (3), prevenzione delle mutazioni attraverso la produzione di antiossidanti (4), aumento dell'apoptosi di cellule anormali. (Turpin et al. 2010).

Inoltre il consumo di alimenti probiotici può inibire la proliferazione di cellule danneggiate, incrementando il processo apoptotico o riducendo la produzione dei fattori di crescita.

E' noto che i cancerogeni possono indurre mutazioni in presenza dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS). La capacità dei probiotici di ridurre la reattività dei ROS ha di conseguenza, l'effetto di ridurre il rischio di mutazioni (Moody & Hassan, 1982).

E' stato inoltre osservato che alcuni lattobacilli possono adsorbire sostanze cancerogene alle loro pareti cellulari o metabolizzare ammine aromatiche eterocicliche riducendo così la loro genotossicità.

Quelli elencati in precedenza, sono solo alcuni degli effetti benefici, che riguardano la prevenzione del processo di carcinogenesi da parte dei batteri probiotici, ma le loro azioni sui diversi meccanismi d'azione o sui diversi enzimi sono molteplici e non completamente note.

2. 6. 2. Potenziali effetti benefici nelle patologie cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari sono responsabili di circa un terzo dei decessi in tutto il mondo.

I batteri probiotici possono prevenire l'ipertensione grazie alla loro capacità di produrre inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), e possono prevenire l'ipercolesteremia degradando i sali biliari.

L'angiotensina fa parte del sistema renina-angiotensina, ed è una sostanza in grado di stimolare il rilascio di aldosterone, il quale a sua volta determina il riassorbimento di sodio e acqua che porta a vasocostrizione e aumento della pressione sanguigna.

Il precursore inattivo dell'angiotensina è l'angiotensinogeno, il quale è convertito dalla renina nella forma inattiva angiotensina I e successivamente nell'angiotensina II dall'azione dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE). E' stato evidenziato che numerosi ceppi di *Lactobacillus* possono produrre peptidi bioattivi capaci di inibire in varia misura l'attività dell' ACE. Alcuni probiotici possono prevenire l'ipercolesterolemia grazie alla loro attività idrolasica mediata dalla BSH. In tal modo promuovono l'utilizzo del colesterolo da parte del fegato (Klaver & van der Meer, 1993). Un'azione analoga potrebbe essere prodotta anche dalla capacità dei probiotici di precipitare il colesterolo; attività osservata *in vitro* (Mathara et al., 2008). E' stato dimostrato, in topi sottoposti a una dieta ricca di colesterolo, con o senza *L. acidophilus* ATCC 43121, che la concentrazione sierica di colesterolo nei topi che avevano ingerito i lattobacilli era notevolmente più bassa (Park et al., 2007).

Altri autori hanno dimostrato, sempre nei topi, che l'ingestione di *L. plantarum* KCTC3928 ha degli effetti ipocolesterolemici imputabili alla capacità da parte dei batteri di modulare i geni chiave e le proteine coinvolte nel metabolismo epatico del colesterolo (Jeun et al., 2009).

2. 6. 3. Effetti nelle infiammazioni intestinali

I processi infiammatori sono risposte fisiologiche a vari stimoli, come infezioni o lesioni tissutali.

In alcune situazioni il processo infiammatorio persiste per lungo tempo, trasformandosi in un processo infiammatorio cronico, come nel caso della IBD (*Inflammatory Bowel Diseases*) (Duchmann et al., 1995).

Le IBD più conosciute sono il morbo di Crohn e la colite ulcerosa. I pazienti che soffrono di IBD, presentano dolori addominali, diarrea ed altri sintomi.

I pazienti affetti da IBD vanno dal 3% al 15% della popolazione e le cause di queste patologie sono multifattoriali e comprendono alterazioni del sistema immunitario e la predisposizione genetica (Cremonini & Talley, 2005).

Sebbene non sia conosciuta una cura medica specifica per le IBD, il ricorso a terapie antinfiammatorie o a farmaci steroidei può ridurre i sintomi associati alle IBD e portare anche ad una prolungata remissione della sintomatologia (Hanauer, 2002; Macdonald & Monteleone, 2005)

Gli effetti immunomodulatori dei probiotici rappresentano uno strumento promettente per il trattamento delle IBD, anche se in realtà il meccanismo d'azione responsabile dei miglioramenti osservati non è stato ancora chiarito (Quigley & Flourie, 2007).

A tale riguardo è stato osservato che *L. rhamnosus* GG migliora la funzione della barriera intestinale nei bambini affetti da morbo di Crohn (Gupta et al., 2000), e che alcuni probiotici possono determinare una riduzione della produzione di citochine pro-infiammatorie così come *L. casei* Shirota è in grado di ridurre, in modelli murini con IBD cronica, la produzione della citochina pro-infiammatoria IL-6 o la traslocazione nucleare di NF-kB (Matsumoto et al., 2005; Lee et al., 2008).

2. 6. 4. Azione antidolorifica

E' stato recentemente dimostrato, che i probiotici possono modulare la percezione del dolore mediante meccanismi che si ipotizza coinvolgano l'attivazione di cellule del sistema immunitario in grado di modulare le terminazioni sensoriali, e/o attraverso la regolazione delle tight-junctions. E' stata proposta anche la possibilità di una interazione tra *L. reuterii* ed un canale ionico dei nervi sensoriali dell'intestino con conseguente modificazione della motilità intestinale e della percezione del dolore (Kunze et al., 2009). Altri studi hanno portato a ipotizzare un incremento della trascrizione dei geni codificanti per un recettore degli oppioidi con proprietà analgesiche, e dei recettori cannabinoidi CB2, coinvolti nella trasmissione del dolore.

2. 7. Lattobacilli e immunomodulazione

2. 7. 1. Le allergie

Le patologie allergiche possono colpire anche soggetti in età infantile e rappresentano per questi pazienti i disordini cronici più diffusi a livello mondiale (WHO, 1998)

Recentemente molti studi si sono focalizzati sulle capacità dei probiotici di migliorare la sintomatologia delle persone affette da allergie (Kalliomaki et al., 2010); capacità che può essere messa in relazione con il ruolo dei probiotici nello sviluppo e maturazione del tessuto linfoide associato all'intestino (GALT).

E' stato dimostrato che in questo ambito gli effetti dei probiotici sono più efficienti nei bambini che negli adulti in quanto i batteri contribuiscono allo sviluppo del sistema immunitario, ed in particolare a quello del tessuto linfoide intestinale, proprio durante la crescita. In condizioni normali, il GALT inizia a maturare durante la gravidanza e l'ambiente materno promuove la risposta immunitaria Th2 iniziale nel neonato, risposta che passa al tipo Th1 non-allergica dopo la nascita, per consentire alla microflora intestinale di stabilizzarsi (Calder et al., 2006; Falk et al., 1998).

Perciò l'ingestione di batteri non patogeni è una strategia interessante per aiutare la maturazione di GALT e ridurre i rischi d'infezione (fig. 3).

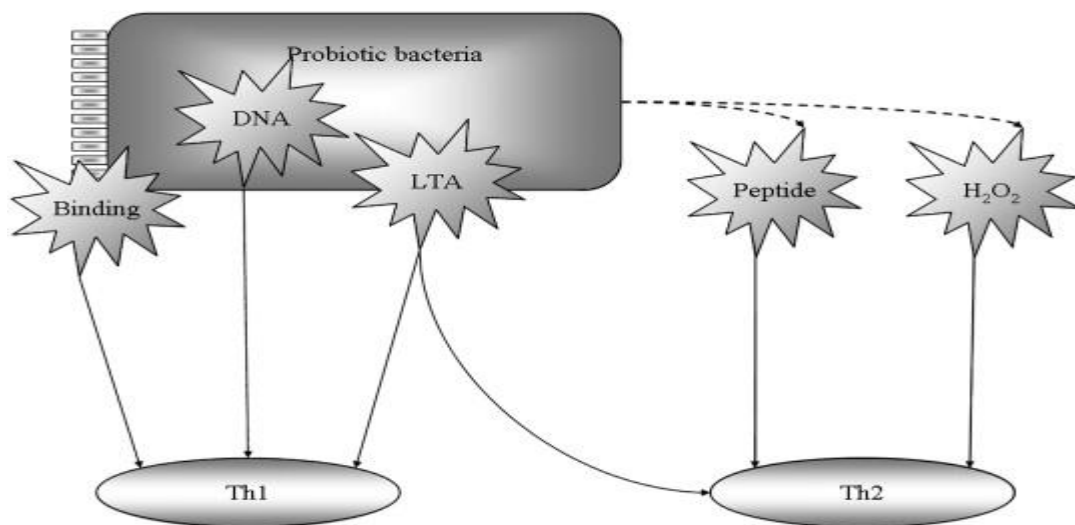


Figura 3. Stimolazione di Th1 e Th2 da parte dei probiotici e secrezione dei metaboliti associati alla stimolazione immunitaria. (TURPIN ET AL. 2010).

Facendo ingerire ai bambini supplementi contenenti lattobacilli si è potuto osservare un effetto benefico nel trattamento della dermatite atopica (Douglas et al., 2010; Rosenfeldt et al., 2003) e dell'eczema (Kalliomaki et al., 2001).

2. 7. 2. L'immuno-modulazione e Adesione

Alcuni studi sembrano indicare che la risposta immunomodulatoria, può essere legata alla capacità dei batteri di adesione al tratto gastrointestinale.

Ad esempio *L. plantarum* 299v è capace di stimolare la produzione della citochina IL-8 da parte di cellule HT-29 ma la produzione di questa citochina diminuisce nel momento in cui viene inibita l'adesione a tali cellule (McCracken et al., 2002).

Alcuni probiotici sono in grado di promuovere la secrezione delle IgG, con conseguente agglutinazione e immobilizzazione degli agenti patogeni (Ibnou-Zekri et al., 2003). Questa proprietà è stata studiata mettendola in relazione alla

capacità di adesione; tuttavia, i risultati non hanno permesso di dimostrare una correlazione evidente tra queste due proprietà.

2. 8. Lattobacilli e protezione contro i patogeni

Tra gli effetti benefici dei probiotici molti studi riportano, oltre alla complessiva stimolazione del sistema immunitario, effetti specifici contro i microrganismi patogeni, come i virus, i batteri e i funghi. Per pervenire le infezioni l'organismo ha la capacità di rilasciare vari metaboliti che mantengono l'omeostasi microbica. Alcuni probiotici mostrano un'azione sinergica con il sistema immunitario esplicita mantenendo l'integrità della barriera intestinale, inibendo l'alimentazione dei patogeni, o distruggendo le tossine prodotte da alcuni patogeni.

2. 8. 1. Miglioramento della barriera intestinale

Anche se non sono stati chiaramente dimostrati i vari meccanismi d'azione, è stato evidenziato che i probiotici hanno la capacità di rafforzare la barriera intestinale e quindi di limitare l'infezione da parte dei patogeni.

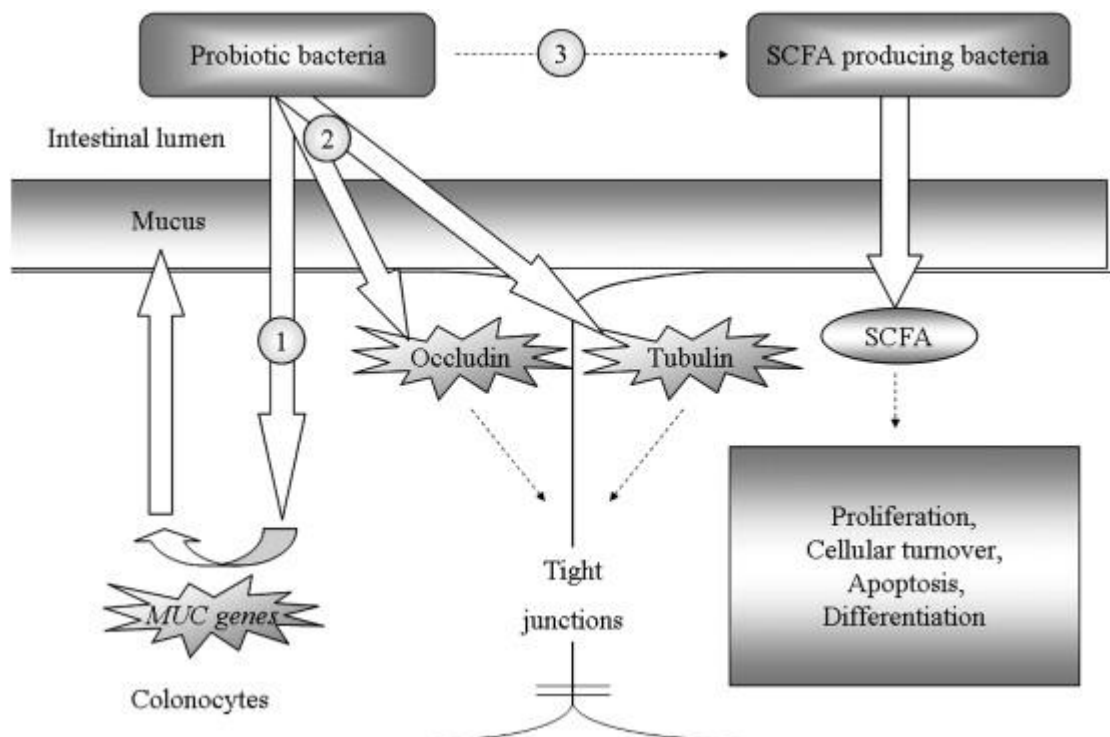


Figura 4. I probiotici possono proteggere la barriera intestinale attraverso (1) l'induzione dei geni muc, (2) il rinforzo delle tight junction e presumibilmente (3) anche tramite la produzione degli acidi grassi a catena corta (SCFA) e i loro effetti sugli enterociti. (Turpin et al. 2010).

Ad esempio *L. plantarum* WCFS1 è in grado di indurre i geni coinvolti nella proliferazione cellulare nella mucosa intestinale di soggetti sani (Troost et al., 2008) mediante un meccanismo riportato in fig. 4.

Le *tight junctions* evitano il passaggio di fattori potenzialmente nocivi, dal lume gastrointestinale al tessuto epiteliale. Le giunzioni sono formate dall'organizzazione di proteine differenti come l'occludina, l'E-caderina e la β -catenina. *L. rhamnosus* GG secreta due proteine (p40 e p75) in grado di ridurre il danneggiamento indotto da H₂O₂ in cellule Caco-2 alla funzione di barriera (Seth, 2008). Le proteine p40 e p75 hanno la capacità di modificare la distribuzione dell'occludina, dell'E-caderina e della β -catenina. Il ceppo DSM 166698T di *L. sobrius* evita il danneggiamento delle barriere di membrana delle cellule IPEC-1, impedendo la defosforilazione dell'occludina causata da *E. coli* K88 (Roselli et al., 2007).

È stato inoltre osservato *in vitro* che *L. plantarum* 299v determina un aumento dell'mRNA delle mucine MUC2 e MUC3 in cellule HT-29, e che l'adesione di *E. coli* a tali cellule era inibita (Mack et al., 2006).

2. 8. 2. Competizione con i patogeni

L'esclusione competitiva è comunemente definita come lo stato in cui due specie, in presenza di condizioni "ecologiche" costanti, competono tra di loro per una stessa risorsa e non riescono a stabilire una coesistenza.

A tale riguardo, alcuni probiotici mostrano l'abilità di colonizzare efficacemente specifiche nicchie lungo il tratto gastro-intestinale. Anche se questa specifica caratteristica dei probiotici non è interamente responsabile dell'inibizione alla colonizzazione da parte degli organismi patogeni dei medesimi siti, certamente vi contribuisce (fig. 5).

I probiotici hanno la capacità di legarsi alla matrice intestinale, in quanto sono dotati di proteine che ne permettono l'adesione, ed in particolare di proteine direttamente responsabili dei fenomeni di adesione al muco intestinale (Buck et al., 2005), e di proteine del metabolismo centrale coinvolte nei fenomeni di adesione. Alcune di queste proteine hanno una funzione centrale nella glicolisi (Castaldo et al., 2009; Kinoshita et al., 2008) e nella sintesi proteica (Granato et al., 2004) ed è stato dimostrato che svolgono un ruolo anche nella capacità di adesione dei lattobacilli. L'occupazione preventiva dei siti di adesione da parte dei lattobacilli ostacola l'ancoraggio dei patogeni facilitando in tal modo la loro eliminazione a seguito della progressione del chimo prima, e poi con l'espulsione delle feci. Infatti i risultati di numerosi studi (Turpin 2010) suggeriscono che la regolare ingestione di probiotici possa contribuire a prevenire l'adesione dei patogeni.

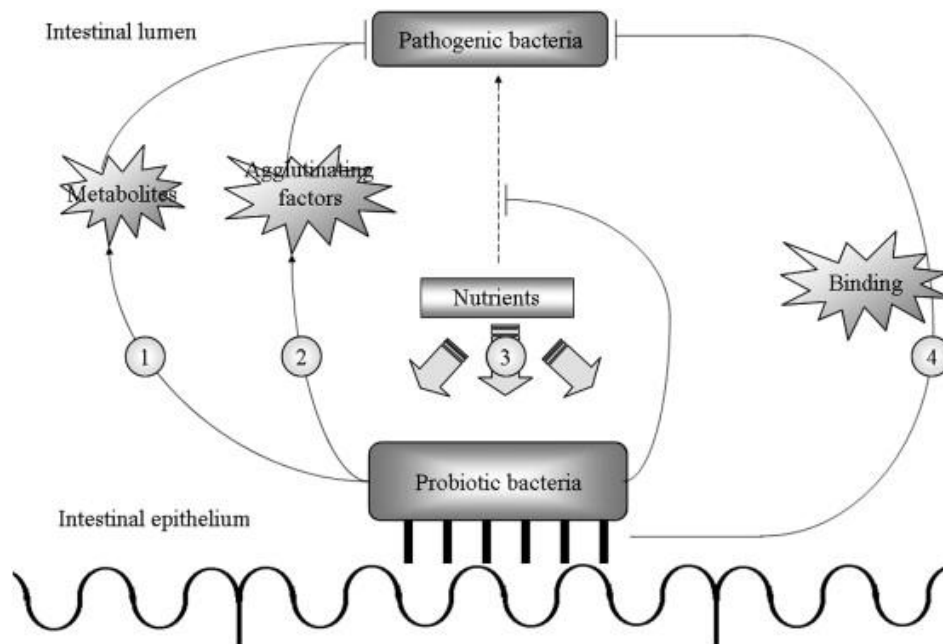


Fig.5 Esclusione competitiva: i probiotici possono inibire lo sviluppo dei patogeni, producendo fattori antibatterici (1), determinando un'agglutinazione dei patogeni (2), competendo per i nutrienti disponibili (3), e occupando le medesime nicchie ecologiche (4). (Turpin et al. 2010).

Un altro fattore importante nella riduzione della colonizzazione da patogeni è la competizione per i nutrienti. *L. brevis*, ad esempio, è dotato di una efficiente deamminasi dell'arginina che sottrae questo substrato necessario all' *H. pylori* inibendone la proliferazione (Famularo et al., 2001; Linsalata et al., 2004; Rousseau et al., 2005).

2. 8. 3. Proprietà antifungine

Poiché la presenza di alcuni funghi è stata rilevata in siti quali ulcere gastriche e del colon, le proprietà antifungine di alcuni batteri probiotici sono da considerare con interesse.

Ad esempio, *L. plantarum* MiLAB 393 inibisce *in vitro* la crescita di vari funghi perché ha la capacità di produrre composti con proprietà antifungine quali l'acido 3-fenil-lattico e due dipeptidi ciclici. (Strom et al., 2002); *L. pentosus* TV35b può produrre una pentocina che inibisce la *Candida albicans in vitro* (Okkers, 1999).

Altri studi hanno evidenziato la capacità di vari ceppi di *Lactobacillus* di inibire lo sviluppo fungino *in vitro*; in particolare, l'acido fenil-lattico e l'acido idrossi-fenil-lattico stati identificati come i composti antifungini prodotti da *L. plantarum* 21 B (Lavermicocca et al., 2000).

Anche *L. rhamnosus* GG ha la capacità di ridurre la colonizzazione enterica della *Candida* nell'uomo con meccanismi non ancora noti. (Manzoni, 2007).

2. 8. 4. Proprietà antivirali

Le infezioni dei *Rotavirus* sono responsabili di severe disidratazioni e diarree, che causano, ogni anno oltre 600.000 casi di morte nel mondo (Parashar et al., 2006). Alcuni studi hanno rilevato che il consumo dei probiotici può determinare una riduzione della durata e dell'intensità degli episodi infettivi in pazienti sofferenti di diarrea (Allen et al., 2004).

I probiotici possono essere attivi anche contro altri tipi di virus, come l'herpes virus, e in letteratura sono state presentate diverse ipotesi che riguardano i diversi meccanismi d'azione. Ad esempio i probiotici possono produrre acido sialico, batteriocine o altre sostanze ancora non identificate con attività antivirale, possono stimolare l'attività del sistema immunitario o inibire l'adesione delle particelle virali. (Turpin 2010).

2. 8. 5. Proprietà antibatteriche

Molti batteri lattici sono capaci di produrre differenti metaboliti, come H₂O₂, batteriocine, acido acetico, acido lattico o ossido nitrico, in grado di ridurre la crescita batterica.

L'acido lattico può inibire la crescita batterica in quanto ha la capacità di rendere permeabili i batteri Gram negativi *in vitro*, ed è anche responsabile dell'aumento del pH intracellulare. Infatti *L. acidophilus* No 4356 produce elevate quantità di acido lattico, con il quale inibisce la crescita di *H. pylori*. L'attività ureasica di alcuni patogeni come *H. pylori* o *Yersinia enterocolitica* permette loro di svilupparsi in ambienti con basso pH, tuttavia alcuni lattobacilli possono inibire questa attività enzimatica mediante la produzione di acido lattico. (Aiba et al., 1998; Lavermicocca 2008).

Anche l'ossido nitrico inibisce la crescita batterica e l'attività antibatterica di alcuni lattobacilli è dovuta alla loro capacità di stimolare la produzione di NO da parte dei macrofagi, o a quella di produrlo direttamente, come può fare ad esempio *L. fermentum* LF1 (Ivec et al., 2007; Karahan et al., 2005; Morita et al., 1997; Xu & Verstraete, 2001).

Le proprietà antibatteriche di molti lattobacilli si esplicano anche mediante la capacità di produrre batteriocine, ossia sostanze ad attività antimicrobica dotate di uno spettro di attività generalmente abbastanza ristretto.

2.9 Il colon

Il sistema digerente presenta funzioni di motilità, secrezione, digestione e assorbimento, tutte necessarie perché un soggetto possa nutrirsi.

La nutrizione è un processo che si realizza attraverso una serie di fasi: riconoscimento del cibo; assunzione; digestione; assorbimento; trasporto dei nutrienti; trasformazione degli stessi in molecole biocompatibili con l'organismo;

utilizzo mediante catabolismo e anabolismo; eliminazione di sostanze indigeribili e scorie metaboliche.

L'apparato digerente è costituito dal tubo digerente (bocca, esofago, stomaco, intestino) e dalle ghiandole ad esso annesse, localizzate nella cavità orale (le ghiandole salivari maggiori parotidi, sottolinguali e sottomandibolari) e nel duodeno (fegato e pancreas).

Quando si parla di intestino, possiamo discriminare l'intestino tenue dall'intestino crasso. Il primo misura circa 3 metri ed è costituito da duodeno (di 20 cm), digiuno (di 1, 1 m), ileo (di 1, 8 m); il secondo, misura circa 1, 5 metri e si può a sua volta suddividere in cieco, colon e retto.

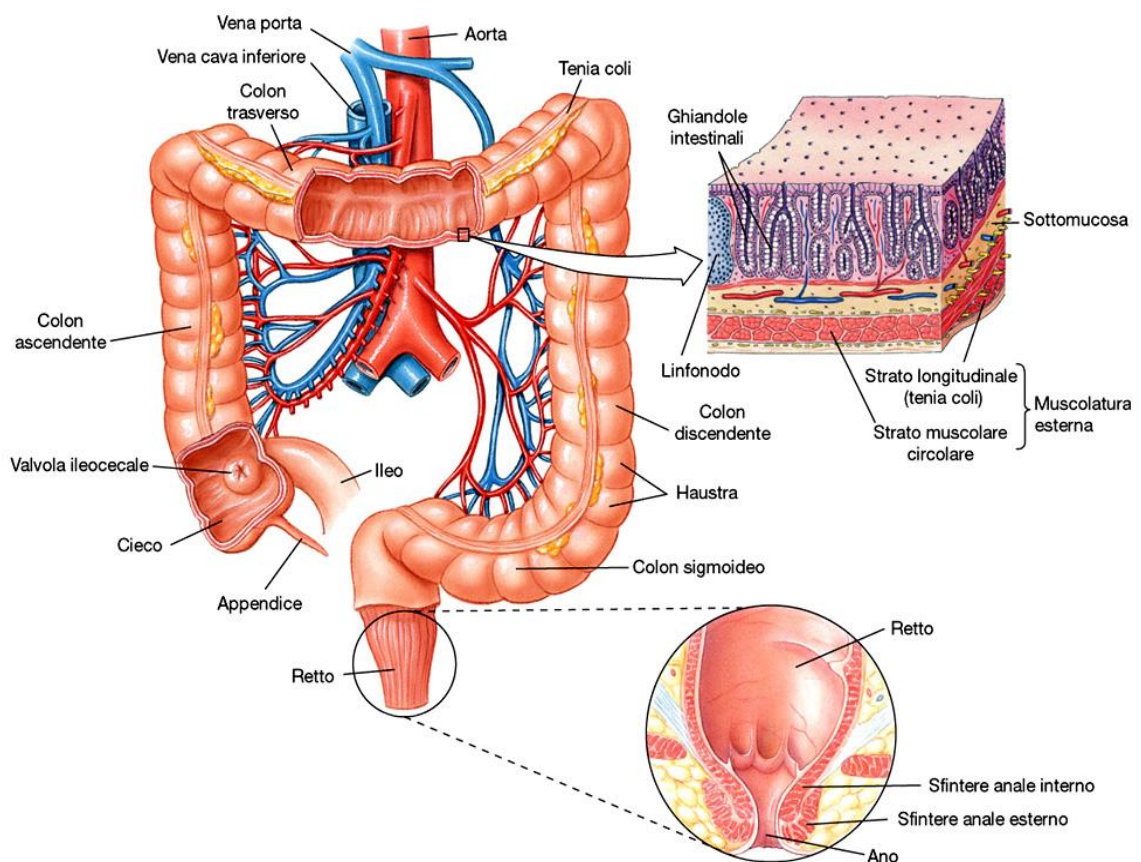


Figura 6. Struttura del colon umano.

L'intestino crasso origina dal tenue attraverso la valvola ileo-cecale, che impedisce il ritorno del chilo (il cibo trasformato, come si presenta nell'intestino) dal colon al tenue, e costituisce il tratto terminale del tubo digerente, dove avvengono le ultime fasi del processo digestivo.

In questo si realizzano:

- Recupero di acqua ed elettroliti.

Quando il cibo raggiunge l'ileo, già il 90% dell'acqua è stata assorbita, ma acqua ed elettroliti rimanenti, come Na^+ e Cl^- vengono recuperati qui, nel colon.

- Formazione e conservazione delle feci.

Nel colon, con il recupero di acqua, il cibo si deidrata, si rimescola con batteri e muco e da così origine alle feci.

- Fermentazione microbica.

I microorganismi che abitano il colon producono enzimi che permettono la digestione di molte molecole, come la cellulosa, non digeribili da parte dei vertebrati e sintetizzano vitamine, quali la vitamina K e alcune vitamine del gruppo B.

L'intestino crasso termina con l'orifizio anale, attraverso il quale si apre all'esterno (figura 6). È situato prevalentemente nella cavità peritoneale dell'addome, solo la sua parte terminale discende nella piccola pelvi e attraversa lo scavo pelvico, per terminare all'esterno nella regione perineale. È di calibro maggiore rispetto all'intestino tenue.

L'intestino cieco ha una borsa che nell'uomo porta un'estensione vermiforme chiamata appendice, lunga in media 7 cm, a funzione immunitaria, che può andare incontro a infiammazioni.

Il colon costituisce la maggior parte della lunghezza dell'intestino crasso ed è formato da una porzione di colon ascendente, una di colon trasverso, una discendente, dal colon sigmoideo e dal retto.

Il *colon ascendente* misura 14 cm, sale fino al lobo epatico destro, piega medialmente formando la fessura colica destra, o epatica, e qui da origine al colon trasverso.

È un organo retroperitoneale, poiché il peritoneo lo tiene adeso alla parete posteriore dell'addome, non rivestendolo interamente, ma esclusivamente alle pareti anteriore, laterale e mediale.

Il *colon trasverso*, detto anche *orizzontale*, prosegue per 50 cm fino alla milza, dove si ripiega in basso, formando la fessura colica sinistra o lienale. È quasi interamente rivestito dal peritoneo che, nella regione centrale, forma il mesocolon trasverso che divide la cavità peritoneale in una regione sovramesocolica ed una sottomesocolica.

Il *colon discendente*, prosegue verticalmente in basso verso la fossa iliaca sinistra. Ha una lunghezza di 25 cm ed è anch'esso retroperitoneale.

Il *colon sigmoideo*, detto anche *ileopelvico* o *sigma*, origina dalla fossa iliaca sinistra e raggiunge lo scavo pelvico, in un percorso sinuoso di circa 40 cm. È rivestito dal peritoneo e, in corrispondenza della terza vertebra sacrale, piega in basso proseguendo come intestino retto e sboccando all'esterno attraverso l'orifizio anale.

L'*intestino retto* (lungo 15 cm) è formato dall'ampolla rettale, una porzione pelvica dilatata, e dal canale anale, più ristretto. Attraversa il pavimento pelvico e prende rapporto con i muscoli qui presenti, come l'elevatore dell'ano e lo sfintere esterno dell'ano. A controllare l'apertura del canale anale sono gli sfinteri anali interno ed esterno. Lo sfintere anale interno, detto anche liscio,

non è altro che un inspessimento della muscolatura circolare liscia del retto ed è innervato dal sistema nervoso autonomo. Lo sfintere anale esterno, o striato, così detto perché costituito da fibre striate, è localizzato più distalmente ed è innervato dalle fibre motrici somatiche dei nervi pudendi, che permettono il controllo, tanto riflesso quanto volontario, della defecazione.

Al colon giungono circa 500-1500 ml di chilo al giorno. Lo sfintere ileo-ciecale, in condizioni normali, permette al chilo di passare nel colon con una velocità sufficientemente bassa da consentire al colon stesso l'assorbimento della maggior parte dei sali e dell'acqua qui presenti. In questo modo la quantità di acqua residua nelle feci sarà di 50-100 ml al giorno. Il colon si contrae permettendo il rimescolamento del chilo, che si muoverà lungo la superficie mucosale molto lentamente, con una velocità massima di 5-10 cm/ora. Due o tre volte al giorno si verifica un'onda peristaltica, chiamata movimento di massa, che è un'onda di contrazione durante la quale i segmenti che si contraggono rimangono in questa condizione per diverso tempo, spingendo in direzione aborale il contenuto di gran parte del colon. Le feci si raccolgono nell'ampolla rettale e vengono espulse, al momento dell'evacuazione, attraverso l'orifizio anale.

La parete intestinale è formata da più tonache, che si sovrappongono l'una all'altra. Queste sono, dall'interno verso l'esterno, la tonaca mucosa, la tonaca sottomucosa, la tonaca muscolare e la tonaca avventizia (figura 7).

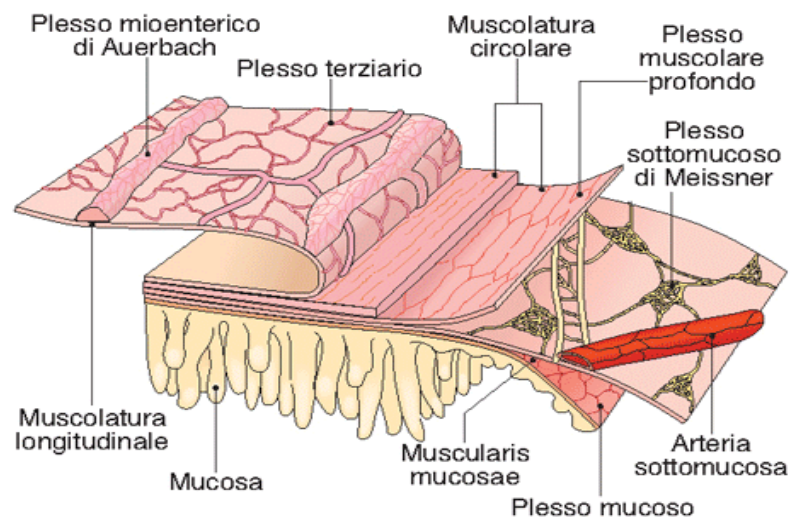


Figura 7. La parete del tratto gastrointestinale.

La *tonaca mucosa* è costituita dall'epitelio che riveste tutto il tratto gastrointestinale, l'epitelio di rivestimento; dalla lamina basale, sulla quale l'epitelio stesso poggia; dalla lamina propria, costituita da tessuto connettivo

lasso, ricco di collagene ed elastina, contenente vasi sanguigni, linfatici, terminazioni nervose e ammassi di tessuto linfoide; dalla *muscularis mucosae* formata da due strati di cellule muscolari lisce, dove quello interno decorre in senso circolare e l'esterno in senso longitudinale.

La *tonaca sottomucosa* è formata da tessuto connettivo fibrillare lasso, attraversata da vasi sanguigni e linfatici, ricca di ghiandole che secernono nel lume del tratto gastrointestinale soluzioni ed enzimi necessari per le funzioni digestive.

La *tonaca muscolare* è formata da una tonaca muscolare interna, ad andamento circolare, ed una tonaca muscolare esterna, longitudinale e meno spessa della prima, entrambe formate da cellule muscolari lisce ed adibite al rimescolamento e alla propulsione del contenuto luminale.

Queste due tonache sono attraversate da una fitta rete di fibre nervose, che viene a costituire il plesso sottomucoso o plesso di Meissner, nella tonaca sottomucosa, e il plesso mioenterico o plesso di Auerbach, tra gli strati longitudinale e circolare della tonaca muscolare. Questi plessi sono raggiunti dalle fibre postgangliari adrenergiche, che raggiungono anche le cellule secernenti esocrine, per controllarne l'attività, e dalle fibre pregangliari, che formano sinapsi con il corpo delle postgangliari colinergiche, qui localizzate.

La *tonaca avventizia* è anch'essa formata da connettivo lasso interstiziale, dove passano vasi e nervi. In alcuni tratti della cavità addominale è esposta, prende il nome di sierosa e avvolge gli organi della cavità peritoneale, costituendo il foglietto viscerale del peritoneo. La sierosa è formata da connettivo ed è ricoperta dal mesotelio, un epitelio pavimentoso semplice.

Nell'intestino tenue la tonaca sottomucosa si solleva a formare i villi intestinali, che hanno lo scopo di aumentare la superficie dell'intestino di circa 8 volte. Alla base dei villi si creano le cripte del Lieberkühn, costituite da cellule immature in continua mitosi, che si differenziano durante il loro movimento verso la sommità del villo, dove giungono mature e vengono espulse. Questo processo garantisce il *turn-over* cellulare, di notevole importanza a livello intestinale, poiché qui la presenza di sostanze tossiche può facilmente comportare l'alterazione delle cellule. Inoltre, il pool enzimatico delle cellule che si sfaldano contribuisce ai processi digestivi.

Nell'intestino crasso i villi non ci sono, ma per invaginazione dell'epitelio nella lamina propria si originano le cripte del Lieberkühn, che si estendono in profondità e si aprono sulla superficie del lume. Queste sono ghiandole tubulari semplici, contenenti cellule principali (secernenti acqua ed elettroliti); cellule mucipare (secernenti muco); cellule endocrine (secernenti serotonina); cellule di Paneth (secernenti lisozima). Queste ultime si trovano alla base delle ghiandole e sono ricche di granuli eosinofili, dove è contenuto il lisozima (enzima proteolitico ad azione antibatterica), hanno funzione di difesa e funzione regolatoria della flora batterica intestinale.

La mucosa del colon è più spessa e resistente rispetto a quella del tenue e presenta delle pliche irregolari, longitudinali e trasversali, che scompaiono quando il canale è pieno e si distende.

L'epitelio di rivestimento della mucosa è formato da enterociti, ai quali si intercalano cellule caliciformi mucipare.

Gli *enterociti* sono cellule alte, prismatiche, spesse 25 μm , il cui nucleo è ovale e si trova alla base della cellula stessa. Sul versante apicale, per la presenza di microvilli, modificazioni del plasmalemma che aumentano la superficie assorbente, si forma l'orletto striato. Nell'intestino crasso l'orletto a spazzola risulta essere più basso rispetto a quello che si forma nel tenue. Su questo è distribuita una gran quantità di glicocalice, sottoforma di lunghi filamenti ramificati, che ha lo scopo di proteggere le cellule del lume dall'autodigestione. I filamenti di actina del microvillo sono ancorati ai filamenti intermedi del citoscheletro. Il loro citoplasma è ricco di endosomi.

Gli enterociti formano una lamina di tessuto compatta e continua grazie a sistemi di giunzione di membrana, localizzati sulla loro superficie laterale, vicino alla zona apicale delle cellule. Questi, costituiti da una zonula occludente, una zonula aderente e da desmosomi, chiudono gli spazi intercellulari, separandoli dal lume, in modo da impedire l'accesso del contenuto luminale. Così le loro superfici laterali si interdigitano, formando uno spazio intercellulare irregolare che si amplia durante l'assorbimento. In relazione alla loro funzione assorbente e secernente, gli enterociti sono cellule polarizzate, dove si riconosce una superficie apicale ed una baso-laterale.

Le *cellule caliciformi mucipare* sono ghiandole unicellulari esocrine con forma a calice che producono la mucina. Questa lubrifica il contenuto intestinale, per facilitarne la progressione nel lume e proteggere l'epitelio. Il loro numero aumenta man mano che ci si sposta in senso aborale. A livello basale, sono a contatto con la lamina basale, mentre a livello apicale si affacciano sul lume. La regione apicale, definita teca, è più ampia della porzione basale, dove è localizzato il nucleo, ed è ricca di gocce di secrezione.

La muscolatura longitudinale non riveste tutto l'intestino crasso, ma forma tre strutture a nastro dette tenie. Le tenie si presentano come dei rilievi, alle cui gibbosità corrispondono tre serie di tasche, dette haustrae. Le haustrae sono delimitate superiormente e inferiormente da pliche falciformi semilunari, corrispondenti ai solchi esterni che si estendono fra due tenie e costituite dalle tonache intestinali interne. La muscolatura circolare è invece continua e, nella parte terminale del retto, si addensa formando lo sfintere anale interno.

L'irrorazione dell'intestino crasso si realizza grazie all'arteria mesenterica superiore e all'arteria mesenterica inferiore. La prima irroro fino alla metà destra del colon trasverso e la seconda la restante porzione. Le vene, che drenano il sangue circolato insieme ai nutrienti assorbiti, si riversano nella vena mesenterica superiore e nella vena mesenterica inferiore, che sboccano nella vena porta, dove confluisce anche il sangue refluo dallo stomaco e dal retto.

Questa riversa il sangue nei sinusoidi epatici, dove arriva anche il sangue proveniente dall'arteria epatica, i quali si riversano prima nella vena centrolobulare, poi nelle vene epatiche, per finire in ultimo nella vena cava inferiore. Nel retto ci sono invece le vene rettali o emorroidali medie e inferiori che sfociano nella vena iliaca interna e poi nella vena cava inferiore.

2.9.1. Neurologia e motilità del colon

L'apparato gastrointestinale è innervato da innervazione intrinseca ed estrinseca. L'innervazione intrinseca è costituita da neuroni del sistema nervoso enterico, mentre quella estrinseca è costituita dal sistema nervoso autonomo ortosimpatico e parasimpatico. L'interazione di questi due tipi di innervazione consente un controllo accurato delle funzioni gastrointestinali.

Il sistema nervoso enterico è anche chiamato "cervello intestinale", perché capace di coordinare molte funzioni del tratto gastrointestinale, indipendentemente dal sistema nervoso autonomo estrinseco. È costituito da fibre nervose e cellule gangliari, organizzate a formare i plessi intramurali di Auerbach e di Meissner, localizzati nello spessore della parete intestinale.

La muscolatura intestinale ha innervazione di natura ortosimpatica, con effetto prevalentemente inibitorio, e parasimpatica, con effetto eccitatorio.

Per quel che riguarda l'innervazione ortosimpatica, dal midollo spinale originano delle fibre pregangliari colinergiche, che fanno sinapsi nel ganglio celiaco (per l'intestino tenue, ma anche per stomaco, fegato e pancreas) e nel ganglio ipogastrico (per l'intestino crasso). Da qui, le fibre postgangliari adrenergiche raggiungono i neuroni dei plessi di Auerbach e di Meissner per controllarne l'attività, determinando effetti sulle cellule muscolari e sulle cellule secernenti e assorbenti. Quando queste fibre sono stimulate si ha vasocostrizione; inibizione della muscolatura esterna, così da arrestare i movimenti del colon; contrazione della muscolaris mucosae e riduzione dell'attività secernente.

Per l'innervazione parasimpatica ci sono le fibre pregangliari colinergiche, che provengono dal nucleo del vago del midollo allungato, dal quale origina il nervo vago (per esofago, stomaco, intestino tenue e colon fino al trasverso) o dai nuclei sacrali S2-S4, dai quali originano i nervi pelvici (per la restante parte del colon, retto e ano). Le fibre pregangliari formano sinapsi con le fibre postgangliari, colinergiche, il cui corpo è localizzato nei plessi sottomucoso e mioenterico. Di conseguenza queste fibre postgangliari innervano i muscoli lisci e le cellule secernenti del tratto gastrointestinale, stimolando l'attività motoria e secretoria dell'intestino.

Le fibre efferenti del plesso mioenterico innervano le cellule della muscolatura liscia, longitudinale e circolare, modulandone l'attività elettrica, il tono muscolare e il ritmo delle contrazioni. Il plesso sottomucoso, invece, regola principalmente l'attività secretoria delle cellule ghiandolari, endocrine ed epiteliali. Le fibre

afferenti di entrambi i plessi conducono gli impulsi sensoriali dai meccanocettori e dai nocicettori al sistema nervoso centrale (SNC).

La motilità intestinale è estremamente controllata. Nell'intestino, a differenza di esofago e stomaco, la peristalsi non è esclusivamente propulsiva, ma anche segmentaria, in quanto la muscolatura circolare e quella longitudinale si contraggono in modo sfalsato. Con questo tipo di contrazione, mentre in alcune regioni si contrae la muscolatura circolare e la longitudinale è rilasciata, contemporaneamente in altre avviene esattamente il contrario, cioè è la muscolatura circolare a essere rilasciata, mentre la longitudinale è contratta. L'alternanza di questo tipo di contrazioni permette il rimescolamento del *chilo* ed il contatto con enzimi digestivi e con la mucosa.

Nel colon la motilità è principalmente segmentaria e si divide in:

- movimenti di segmentazione, cioè di rimescolamento, che ostacolano la progressione del contenuto colico, facilitando l'assorbimento di acqua e sostanze nutritive;
- movimenti di massa (una - tre volte al giorno), responsabili dello spostamento in direzione aborale del contenuto intestinale, più frequenti nel colon trasverso e nel discendente;
- movimenti retro-peristaltici, che determinano spostamenti in senso inverso del contenuto intestinale.

Questi movimenti si realizzano grazie all'attività elettrica intrinseca: tra gli strati longitudinale e circolare della tonaca muscolare vi sono cellule mesenchimali interstiziali, che svolgono una funzione di cellule "pacemaker". Queste sono le cellule di Cajal e danno origine al "ritmo elettrico di base" (REB) che, tramite le gap junctions, si propaga rapidamente alle cellule della muscolatura liscia del tratto gastrointestinale. Grazie a questo tipo di giunzioni, le cellule contigue muscolari lisce del tratto gastrointestinale sono tra loro elettricamente accoppiate, soprattutto nello strato circolare, dove le gap junctions sono molto numerose e creano vie a bassa resistenza per la rapida propagazione del potenziale, che viaggia senza decremento.

Le cellule di Cajal possiedono un potenziale di membrana a riposo di -40/-80 mV e si depolarizzano spontaneamente in maniera ritmica, originando delle onde lente. Queste onde non hanno l'ampiezza tale da originare potenziali d'azione e provocare contrazioni. Nel colon ascendente la frequenza delle oscillazioni è di 6 al minuto, nel cieco e nel sigma è minore, mentre nel retto è di 17 oscillazioni al minuto. Frequenza e ampiezza delle onde lente può essere modulata dall'attività di nervi intrinseci, estrinseci ed ormoni. Sotto questi stimoli l'ampiezza delle onde lente può superare la soglia di eccitabilità della cellula, generando potenziali d'azione, che durano 10-20ms e sono dunque di durata maggiore rispetto a quelli delle cellule muscolari striate.

La fase di depolarizzazione del potenziale si realizza grazie al flusso di ioni attraverso i canali cationici lenti del Na^+ e del Ca^{2+} . L'ingresso di questo Ca^{2+} è

importante nella fase d'inizio della contrazione muscolare. Ad influenzare il grado di depolarizzazione delle cellule e la frequenza dei potenziali d'azione sono ormoni e sostanze liberate dai terminali assonici eccitatori. Acetilcolina e sostanza P agiscono in senso positivo, mentre polipeptide intestinale vasoattivo (VIP) e monossido d'azoto (NO) inducono iperpolarizzazione delle cellule fino ad abolire il potenziale d'azione. La frequenza dei potenziali d'azione determina l'intensità di contrazione.

Le onde lente raggiungono il potenziale soglia, con conseguente insorgenza del potenziale d'azione, grazie all'attività parasimpatica del sistema estrinseco. È l'azione dell'acetilcolina sui recettori muscarinici delle cellule muscolari lisce a determinare la depolarizzazione delle membrane.

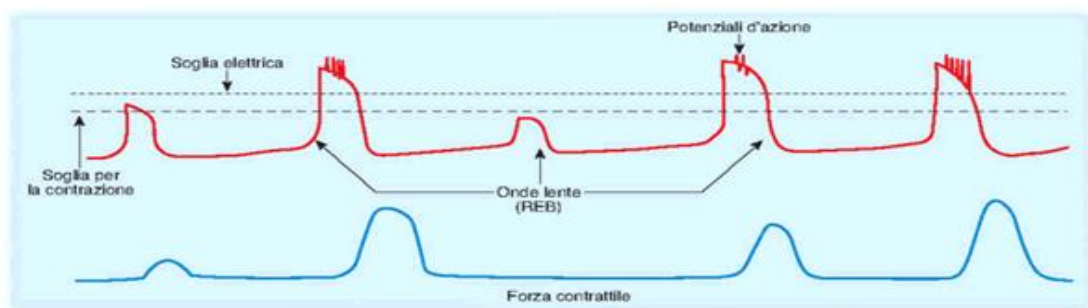


Figura 8. Attività elettrica e contrattile delle cellule muscolari lisce di colon.

L'attività ortosimpatica, mediata dall'adrenalina, ha invece un effetto iperpolarizzante e quindi di inibizione per la contrazione e la peristalsi. Anche il sistema nervoso centrale può, attraverso il sistema neurovegetativo, modificare l'attività motoria del colon. Inoltre, i polipeptidi gastrointestinali possono incrementare la motilità del colon (gastrina e colecistochinina) oppure inibirla (secretina e glucagone).

2.9.2. Funzione intestinale di assorbimento e secrezione

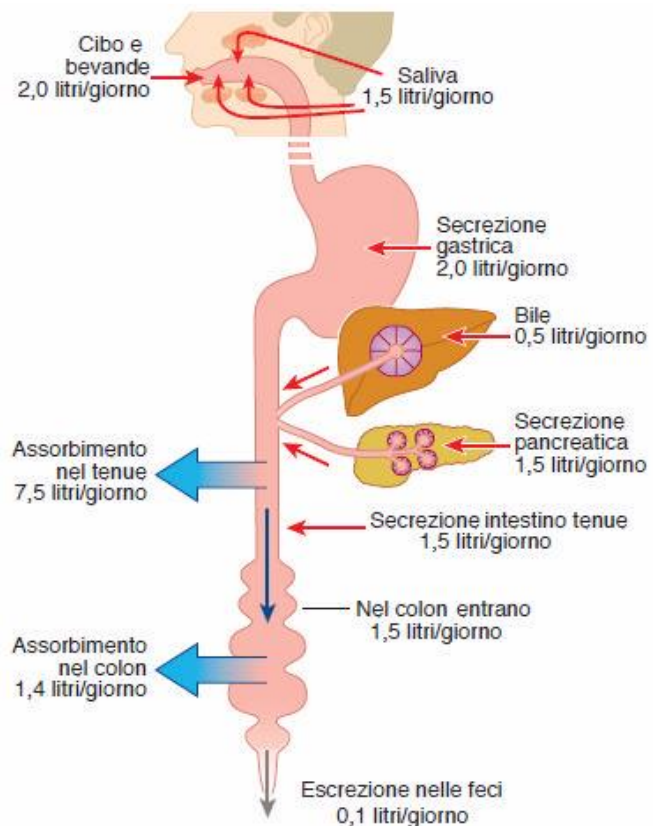
Nell'intestino tenue e nel colon si realizza l'assorbimento di acqua e ioni e la loro secrezione. In condizioni normali, l'uomo assorbe circa il 99% dell'acqua e degli ioni presenti nel cibo ingerito e nelle secrezioni del tratto gastrointestinale.

L'acqua è secreta in grandi quantità nel lume intestinale durante i processi digestivi. La maggior parte di essa è poi riassorbita. La secrezione o l'assorbimento dell'acqua avverranno seguendo il suo gradiente osmotico. Quando il chimo passa nell'intestino non incrementa eccessivamente l'osmolarità del contenuto luminale, ma con la realizzazione dei processi digestivi, l'osmolarità della soluzione nel lume aumenta in maniera considerevole e l'acqua viene richiamata nel lume. Poi, quando le molecole osmoticamente attive sono assorbite, l'osmolarità del contenuto luminale si

riduce e l'acqua viene riassorbita. Nelle cellule delle cripte, dove avviene la secrezione di elettroliti, si realizza anche la secrezione di acqua.

Il responsabile è il canale CFTR (cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator), localizzato sulla membrana apicale delle cellule epiteliali delle cripte. Questo viene attivato dall'aumento della concentrazione di AMPc a livello citoplasmatico, permette la secrezione dello ione cloruro, che si accumula nelle cripte e richiama, per via paracellulare il Na^+ . La secrezione di NaCl determina il richiamo di acqua nel lume. Quotidianamente nel canale digerente entrano 9 litri di acqua. Circa 7 l di questi derivano da ghiandole esocrine e alimenti (2 l sono introdotti con la dieta), mentre 1, 5-2 l sono secreti dall'intestino. Solo il 2% di questi liquidi è perso con le feci (50-100 ml), l'80% è riassorbito dall'intestino tenue, in particolare nel digiuno, e il 18% dal colon. Nel colon se ne realizza tanto l'assorbimento quanto la secrezione. Il movimento dell'acqua segue quello degli osmoliti, come ioni e nutrienti. Il colon ha la capacità, a differenza del resto dell'intestino, di assorbire l'acqua contro pressioni osmotiche maggiori. Gli enterociti che delineano i villi sono la sede principale dell'assorbimento, mentre le cellule nelle cripte sono la sede principale della secrezione. Poiché l'area di superficie dei villi è maggiore rispetto a quella delle cripte, l'assorbimento netto di acqua è favorito. La secrezione di acqua è continua ed è necessaria per mantenere l'intestino umido nei processi interdigestivi.

Figura 9. Bilancio del trasporto di acqua



Per quel che riguarda l'assorbimento degli ioni, lo ione Na^+ attraversa facilmente l'orletto a spazzola per via del suo gradiente elettrochimico favorevole e, grazie

alla $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$, localizzata nella membrana basolaterale, può fuoriuscire dalla cellula raggiungendo i vasi. Questo ione è assorbito lungo tutto l'intestino, soprattutto nel digiuno. Glucosio, galattosio e aminoacidi neutri entrano negli enterociti contro gradiente di concentrazione, grazie ad un trasporto attivo secondario dipendente da Na^+ , un controtrasporto. Nell'ileo la riduzione delle concentrazioni di queste sostanze rende inferiore la velocità di assorbimento del Na^+ . Nel colon l'assorbimento del Na^+ avviene nonostante la concentrazione intraluminale sia di 25 mM, contro i 120 mM del plasma.

Gli ioni cloruro e bicarbonato sono assorbiti in grandi quantità nel digiuno. In ileo e colon normalmente il Cl^- viene assorbito e HCO_3^- viene secreto. Lo scambio $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ avviene grazie ad uno scambiatore anionico presente sull'orletto a spazzola degli enterociti. In certe condizioni il Cl^- può essere anche secreto.

Il K^+ nel digiuno e nell'ileo passa dal lume al sangue grazie al gradiente di concentrazione favorevole, generato dall'assorbimento di acqua. Nel colon solitamente lo ione potassio viene secreto, poiché la sua concentrazione luminale è inferiore a 25 mM. Quando invece la sua concentrazione è maggiore di tale valore, allora viene assorbito. Nel tenue invece non ci sono prove per parlare dell'esistenza di un trasporto attivo.

In condizioni patologiche, come ad esempio durante la diarrea, il colon è capace di secernere NaCl e KCl , in misura eccedente l'assorbimento.

In seguito a questi processi di assorbimento e secrezione, si formano le feci (60-180 g/day), che sono costituite al 76% di acqua e, per il 24%, da sostanze solide (batteri morti, residui alimentari, lipidi, sostanze inorganiche, sostanze azotate, materiale non digerito e componenti secchi dei succhi digestivi, come i sali biliari).

2.9.2.1. TRASPORTO DI SALI E ACQUA NEL COLON

Da studi morfologici e funzionali è emerso come, nella mucosa del colon, le cellule superficiali si presentano differenti da quelle più profonde delle cripte di Lieberkühn. Si nota un diverso grado di specializzazione, diversa attività proliferativa e differenti proprietà funzionali. Infatti, le cellule superficiali hanno una bassa tendenza a proliferare, sono altamente differenziate, mentre le cellule delle cripte hanno più intensa attività proliferativa, minor grado di differenziazione. Come già accennato, le cellule superficiali presentano una funzione essenzialmente di assorbimento, al contrario di quelle delle cripte che provvedono principalmente alla secrezione di NaCl e H_2O . Nonostante questo però, i due tipi cellulari sono capaci di svolgere entrambe le funzioni di assorbimento e secrezione.

Le cellule dell'epitelio del colon dei mammiferi sono altamente conduttive. La densità dei canali ionici sulla membrana luminale delle cellule superficiali è maggiore rispetto a quella delle cellule delle cripte. La distribuzione delle

proteine di trasporto sulle membrane basolaterali e luminali è polarizzata e permette, solitamente, di assorbire NaCl, acidi grassi a catena corta e acqua, e secernere muco, bicarbonato e KCl. Per quel che riguarda l'assorbimento, le principali modalità con cui questo avviene nel colon sono quelle di trasporto elettroneutro e trasporto elettrogenico. Il trasporto elettroneutro si basa sulla presenza di due contro-transportatori che agiscono in parallelo sulla membrana luminale: Na^+/H^+ (NHE, Na^+/H^+ exchanger) e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Il trasporto elettrogenico si avvale della presenza, sempre sulla membrana luminale, di canali del Na^+ (ENaC, epithelial Na^+ channel) amiloride-sensibili. Per il cloruro di sodio, l'assorbimento avviene principalmente tramite trasporto elettroneutro, reso possibile dalla concentrazione luminale del Na^+ , mantenuta alta dalla Na^+/K^+ -ATPasi basolaterale. La pompa agisce contro gradiente, sfruttando l'energia derivante dall'idrolisi dell' ATP, e porta 3 Na^+ all'esterno della cellula e 2 K^+ all'interno. Il Na^+ entra in cellula secondo il suo gradiente elettrochimico in scambio con il protone, grazie allo scambiatore Na^+/H^+ , localizzato sulla membrana luminale. Il protone fuoriesce dalla cellula verso il lume. La concentrazione luminale per la captazione netta di Na^+ è di 25-30 mM. Il Cl^- entra in cellula mediante gli scambiatori anionici apicali, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Cl^-/OH^- . A livello basolaterale il Na^+ lascia la cellula per mezzo della Na^+/K^+ -ATPasi, mentre il Cl^- probabilmente lo fa tramite un cotrasporto K^+/Cl^- e/o uno scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.

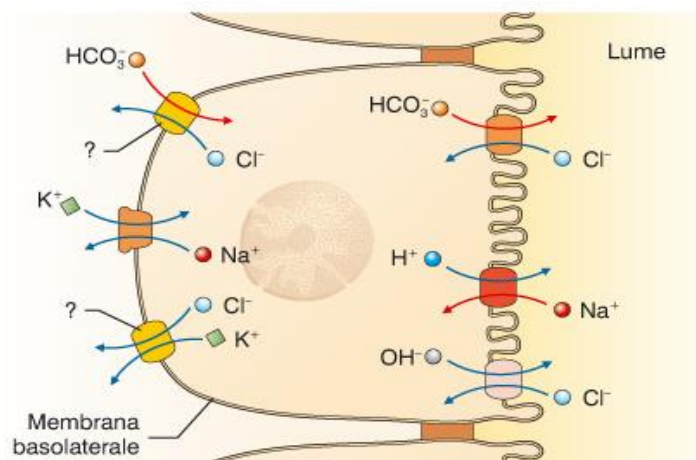


Figura 10. Assorbimento elettroneutro

Nel colon distale si aggiunge anche un trasporto elettrogenico, volto ad aumentare l'ingresso di Na^+ . I responsabili sono i canali epiteliali ENaC, espressi sulle membrane apicali delle cellule epiteliali del colon. Sono canali che vengono inibiti dall'amiloride e dai suoi analoghi, maggiormente selettivi per Na^+ piuttosto che per il K^+ . Lo ione sodio è spinto ad attraversare il canale ed entrare in cellula in virtù del suo gradiente chimico e del potenziale di membrana negativo. Per il principio di elettroneutralità l'assorbimento di uno ione positivo deve avvenire contemporaneamente all'assorbimento di un

anione, in questo caso il Cl^- . Questo viene assorbito sia attraverso canali del Cl^- apicali, AMPc-dipendenti (conosciuti come CFTR) che per via paracellulare. La resistenza paracellulare qui è 20 volte maggiore rispetto alla transepiteliale, tuttavia l'assorbimento di Cl^- per tale via è ugualmente possibile. Ciò è dovuto alla presenza di un potenziale negativo sul versante luminale e alla non-selettività del trasporto paracellulare.

La Na^+/K^+ -ATPasi basolaterale produce un assorbimento netto di Na^+ , invece il Cl^- è trasportato nel sangue mediante canali del Cl^- basolaterali e attraverso lo scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ basolaterale.

L'assorbimento di NaCl è regolato da meccanismi a feedback. L'incremento dell'uscita basolaterale di ioni deve corrispondere ad un aumentato ingresso a livello della membrana apicale. Il canale CFTR può interagire direttamente con il canale ENaC e modulare il trasporto del Na^+ . Però non sempre l'attività dell'ENaC è compensata da quella del CFTR, come nel caso delle cellule delle cripte, dove è espresso il canale per il Cl^- ma non quello per il Na^+ .

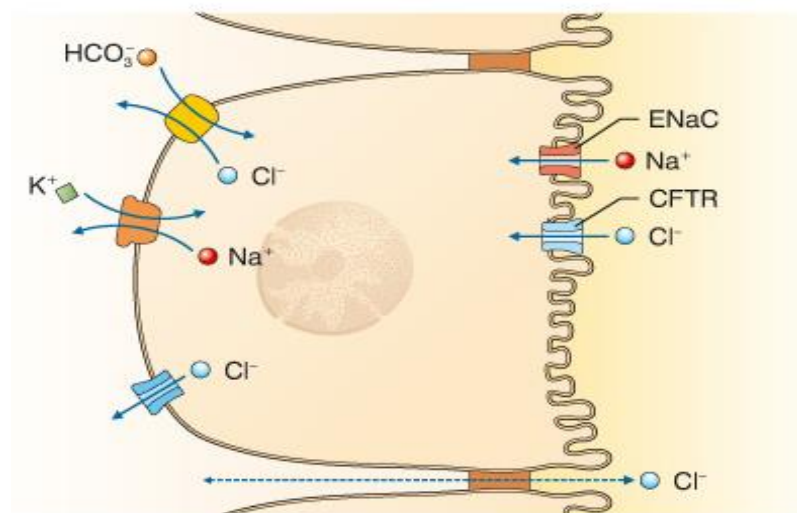


Figura 11. Assorbimento elettrogenico

Il movimento dei soluti attraverso l'epitelio genera un gradiente osmotico che permette il concomitante flusso transepiteliale di acqua. L'assorbimento di acqua è dunque secondario a quello di NaCl e la quantità di acqua assorbita giornalmente è notevole, di circa 1400 ml. L'assorbimento dell'acqua non richiede né cellule specializzate, né villi. L'acqua attraversa l'epitelio del colon umano sia per via paracellulare, in maniera passiva attraverso le giunzioni serrate, che per via transcellulare, per diffusione attraverso il bilayer fosfolipidico e le acquaporine, presenti su entrambe le membrane (basolaterale e apicale) degli enterociti. Queste proteine diminuiscono man mano che ci si sposta dall'intestino tenue prossimale a quello distale, fino al colon, dove la permeabilità all'acqua risulta notevolmente ridotta. Il chilo raggiunge l'intestino crasso ancora ricco di acqua. Qui viene ulteriormente assorbita per evitare la

disidratazione dell'organismo e regolare il contenuto idrico delle feci, che raggiungeranno la giusta consistenza.

Oltre all'assorbimento degli elettroliti, il colon ha un ulteriore ruolo come segmento finale per la secrezione. La secrezione corre parallelamente ed è bilanciata dall'assorbimento degli elettroliti in modo da mantenerne l'omeostasi. In condizioni fisiologiche la secrezione serve a trasportare il muco fuori dalle cripte, mantenendolo ben idratato.

Per la secrezione di una soluzione di sali, le cellule epiteliali producono un flusso di NaCl dal lato basolaterale verso quello luminale, cosicché l'acqua li segua osmoticamente. Sul versante basolaterale è presente anche la proteina trasportatrice $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ del tipo NKCC1 ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotrasporter), che realizza un trasporto elettroneutro sfruttando il potenziale elettrochimico dello ione sodio. Lo ione sodio entrando in cellula permette l'ingresso del K^+ e di due ioni Cl^- . Il K^+ , a differenza delle altre due specie, entra in cellula contro gradiente chimico, agendo da valvola di sicurezza che evita un eccessivo ingresso di Cl^- . L'uscita dello ione Cloruro dalla cellula avviene passivamente, in quanto il suo ingresso ha reso l'ambiente cellulare elettronegativo. Il passaggio è permesso da un canale apicale di tipo CFTR, abbondante sulla membrana dei colonociti, attivato dalla via della AMPc-proteinchinasi A (PKA) e da altre vie di secondi messaggeri, come la PKC, la chinasi Ca^{2+} /calmodulina dipendente e una chinasi GMPc-dipendente. Potrebbero inoltre essere presenti altri canali per il Cl^- , come quelli Ca^{2+} dipendenti, attivati dall'incremento della concentrazione dello ione Calcio in cellula. L'uscita del Cl^- crea una differente elettronegatività fra il compartimento basolaterale e quello luminale. Poiché il compartimento luminale risulta negativo rispetto al sangue, per preservare l'elettroneutralità, verrà richiamato il Na^+ nel lume attraverso la via paracellulare. Il Na^+ e K^+ passano nel sangue attraverso la membrana basolaterale mediante la pompa Na^+/K^+ - ATPasi e canali del K^+ . Sono stati identificati due differenti tipi di canali per il K^+ : quelli attivati dall' AMPc e quelli attivati da incremento citoplasmatico di Ca^{2+} .

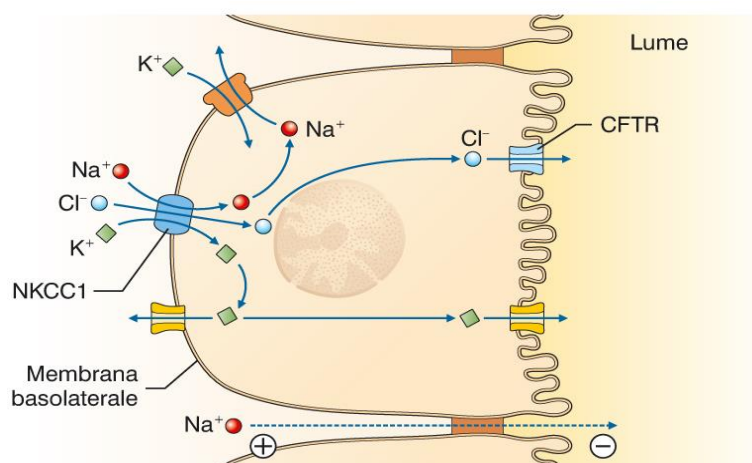


Figura 12. *Secrezione di Cl^- nel colon*

Le cellule del colon presentano anche due differenti tipi di H^+/K^+ -ATPasi. Queste sono espresse sia nelle cellule epiteliali superficiali che nelle cripte, e si distinguono fra loro in base alla sensibilità che mostrano nei confronti di ouabaina e omeprazolo. Le cellule delle cripte presentano solo l'isoforma sensibile all'ouabaina. Queste ATPasi appartengono alla stessa famiglia alla quale appartiene la Na^+/K^+ -ATPasi, cioè alle ATPasi di tipo P.

Come risultato di questi processi si realizza un trasporto transepiteliale di NaCl e KCl, con conseguente richiamo osmotico di acqua. Questa viene secreta sia per via paracellulare, che per via transcellulare, tramite le acquaporine.

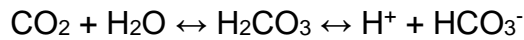
In condizioni patologiche, causate da secretagoghi e da esposizione a tossine batteriche, si può avere una eccessiva secrezione di NaCl e KCl. Questa alterazione del trasporto elettrolitico causa la diarrea. La tossina colerica prodotta dal *Vibrio cholerae*, ad esempio, determina una forte attivazione, spesso permanente, dell'enzima adenilato ciclasi. L'aumento dei livelli di AMPc causa, nelle cellule epiteliali delle cripte di Lieberkühn, l'apertura permanente dei canali del Cl^- CFTR. L'eccessiva secrezione di Cl^- , Na^+ e acqua si manifesta come diarrea profusa (fino a 20l/die di feci acquose). Questi soggetti, se non opportunamente trattati, vanno incontro a morte.

Nei Paesi con condizioni igienico-sanitarie non ottimali, il colera e le altre diarree secretorie costituiscono una delle principali cause di morte nei bambini. I soggetti resistenti allo sviluppo di queste patologie, sono portatori di Fibrosi Cistica. Per questo motivo, in queste regioni, c'è un'elevata incidenza di questa patologia. La fibrosi cistica è una patologia di natura genetica, a trasmissione autosomica recessiva, dovuta ad una mutazione del gene per il CFTR localizzato sul cromosoma 7. Comporta deficit nella secrezione di Cl^- , con conseguente aumento del riassorbimento di Na^+ . Il che causa un aumento del riassorbimento di acqua, con conseguente disidratazione dello strato mucoso che ricopre l'epitelio e alterazione dell'attività mucociliare e secretoria.

Nell'intestino, infatti, si realizza anche la secrezione di sostanze con ruolo protettivo, come muco e ioni bicarbonato. Il muco lubrifica le sostanze indigerite ed è fondamentale per la progressione delle feci in formazione; gli ioni bicarbonato, aderendo al muco, creano una barriera protettiva per l'epitelio, nei confronti di batteri e degli acidi prodotti dalle reazioni metaboliche della flora batterica intestinale.

La secrezione dello ione bicarbonato serve per regolare il pH luminale del colon e favorire l'assorbimento degli acidi grassi a catena corta (SCFA), come il butirrato.

L'assorbimento di questo ione avviene grazie alla presenza del cotrasporto elettroneutro con il Na^+ , presente sulla membrana basolaterale. All'interno della cellula il HCO_3^- si può formare per azione dell'anidrasi carbonica, enzima che catalizza la reazione tra anidride carbonica e acqua per formare acido carbonico, il quale si dissocia molto velocemente producendo idrogeno e bicarbonato:



Sul versante apicale, la secrezione di HCO_3^- avviene attraverso l'efflusso elettrogenico, un controtrasporto $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ luminale e un controtrasporto $\text{SCFA}/\text{HCO}_3^-$ luminale, ma soprattutto nelle cripte mediante i canali del Cl^- CFTR apicali.

Il canale luminale dello ione Cloro consente così sia la secrezione dello ione Bicarbonato, che il riciclo dello ione Cloro.

Le secrezioni nel colon, compensate dall'assorbimento, servono per l'idratazione del muco ed il mantenimento dell'omeostasi idro-salina.

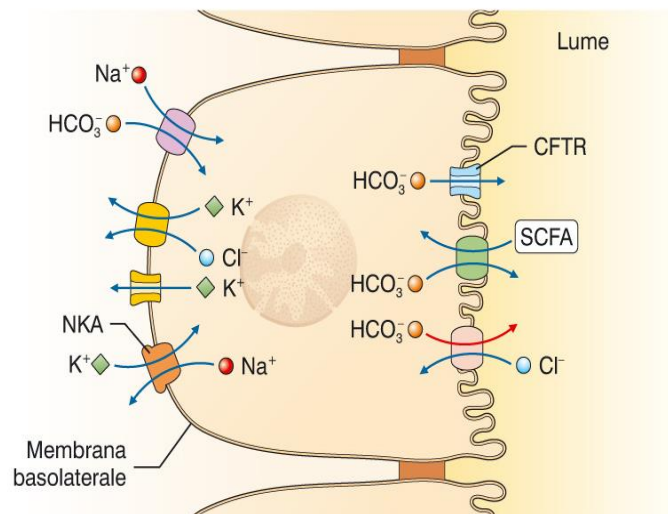


Figura 13. Secrezione di bicarbonato

2.9.2.2. ASSORBIMENTO DEGLI ACIDI GRASSI A CATENA CORTA

Gli acidi grassi a corta catena (SCFA, short-chain fatty acids) sono quegli acidi grassi con un numero di atomi di carbonio inferiore a otto. Questi vengono prodotti dai batteri del colon durante la fermentazione delle fibre dietetiche non digerite nel tenue. I prodotti finali di questa digestione sono acidi grassi volatili, acido lattico, metano, idrogeno e biossido di carbonio. Gli acidi grassi volatili, come l'acido acetico, propionico e butirrico, possono essere assorbiti dai colonociti. Gli SCFA esercitano effetti trofici sull'epitelio e sono, per questo motivo, di notevole importanza per il metabolismo delle cellule del colon.

Nel colon prossimale il loro assorbimento avviene per diffusione non ionica e per via paracellulare. In aggiunta, nel ratto, sulla membrana apicale si è visto essere presente un meccanismo di scambio $\text{SCFA}/\text{HCO}_3^-$.

Il trasporto degli acidi grassi a catena corta è di notevole importanza, poiché regola l'equilibrio del fluido nel colon, l'assorbimento di NaCl e il pH luminale e citosolico. Infatti, come conseguenza del trasporto degli SCFA, viene attivata la

secrezione dello ione bicarbonato, che rende il pH del lume leggermente alcalino (Kunzelmann & Mall 2002).

Fra gli acidi grassi a corta catena vi è il butirrato che, oltre a fornire il 70% dell'energia necessaria ai colonociti, è coinvolto nei meccanismi di regolazione dell'espressione genica, in quanto inibisce l'istone deacetilasi, favorendo lo stato acetilato degli istoni, e dunque, la trascrizione del DNA. Il butirrato ha anche effetti positivi nei confronti dei processi infiammatori del colon-retto e protegge così da patologie tumorali. Inoltre, blocca la crescita delle cellule cancerose e ne induce morte per apoptosi.

2.9.2.3. REGOLAZIONE DEL TRASPORTO DI ELETTROLITI

Tutti questi processi di secrezione e assorbimento sono controllati dall'interazione di stimoli endocrini, paracrini, autocrini e nervosi.

Le afferenze dei plessi di Auerbach e Meissner raggiungono le cellule muscolari, epiteliali e vascolari, regolando così secrezione e assorbimento della mucosa del colon e il flusso di sangue intestinale. La stimolazione ortosimpatica nell'intestino provoca un aumento dell'assorbimento di Na^+ , Cl^- e acqua, a discapito della loro secrezione; al contrario, la stimolazione parasimpatica diminuisce la velocità netta dell'assorbimento di acqua e di elettroliti favorendo la funzione secernente.

Alcuni composti, come i componenti derivanti dal cibo, gli acidi biliari e le tossine batteriche, raggiungono il lume intestinale e rilasciano agenti secretori che, interagendo con i trasportatori, possono alterare secrezione e/o assorbimento, con effetti specifici sulle singole membrane e i diversi distretti del colon. Fra i secretagoghi, vi sono l'acetilcolina (ACh), il peptide intestinale vasoattivo (VIP) e la prostaglandina E2 (PGE2). Questi attivano meccanismi di trasduzione del segnale che coinvolgono differenti processi a livello delle membrane o a livello citosolico, determinando un aumento della concentrazione intracellulare di secondi messaggeri. Fra questi vi sono Ca^{2+} e l'AMPc, che stimolano la secrezione elettrolitica. La secrezione intestinale di NaCl e KCl avviene per via transcellulare, tramite un flusso di ioni Cl^- e K^+ , e per via paracellulare, mediante trasporto di Na^+ verso il lume. Tutti i canali ionici coinvolti nella secrezione, presenti sia nelle membrane luminali che in quelle basolaterali, sono sensibili all'azione del Ca^{2+} e dell'AMPc. La loro azione determina l'attivazione delle vie di efflusso netto del Cl^- (CFTR) e dell'entrata del Cl^- (NKCC). Di conseguenza si verifica un rapido inizio di ipersecrezione e di inibizione dei componenti responsabili dell'assorbimento nel colon.

Il cotrasportatore $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ è coinvolto anche nella regolazione del volume cellulare.

La fosforilazione da parte della PKA, o da parte di altre chinasi e fosfatasi, e lo stimolo da parte dell'AMPc inducono un aumento dell'espressione del trasportatore NKCC1 sulla membrana cellulare. La secrezione di Cl^- si attiva al

momento dell'apertura del canale CFTR e l'intensità del trasporto ionico è regolata dall'attività del cotrasportatore NKCC1. La sua attività è innescata dalla riduzione della concentrazione del Cl^- intracellulare e dalla contrazione cellulare all'inizio della secrezione del Cl^- stesso.

Il canale CFTR è il responsabile principale della secrezione dello ione Cloruro nell'intestino umano. È una proteina di 1500 aminoacidi, costituita dai domini MSD1 e MSD2 (membrane spanning domain).

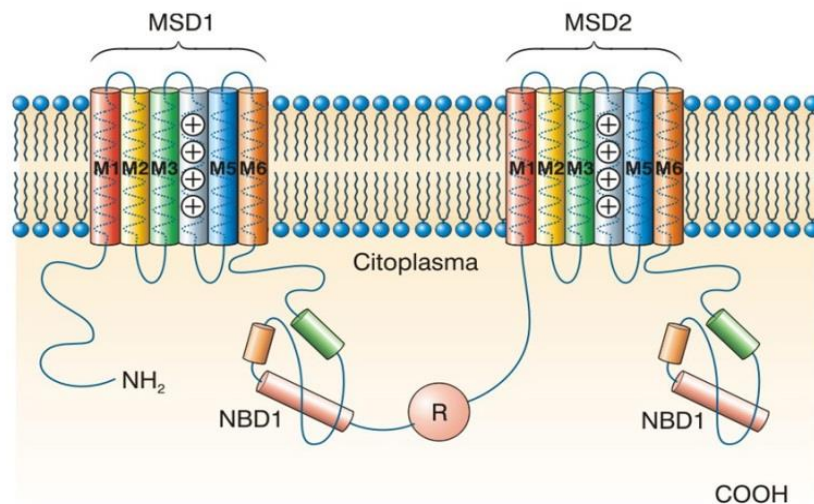


Figura 14. Canale di tipo CFTR

I domini MSD sono formati dai segmenti transmembrana M1-M6, un dominio citoplasmatico idrofobico NBD (nucleotide binding domain) a cui si lega l'ATP e un dominio regolatore citoplasmatico R che separa i due domini proteici transmembrana. Il passaggio dello ione avviene attraverso domini transmembrana, che formano un canale. Questi sono anche coinvolti nei processi energetici di idrolisi dell'ATP. Il dominio regolatore contiene i siti di fosforilazione, ossia i substrati per le proteine chinasi PKA, PKC, CaMK (chinasi Ca^{2+} -calmodulina dipendente) e la PKG (proteina-chinasi G), dipendente dal GMPc. Il gating sembra dipendere dallo stato fosforilativo dei domini NBD: la fosforilazione di uno soltanto o di entrambi i siti NBD permetterebbe l'apertura del canale, con una probabilità maggiore quando entrambi i siti sono fosforilati.

L'AMPc, mediante fosforilazione o defosforilazione dei residui di serina presenti nel dominio regolatore e nei siti di legame per l'ATP, regola lo stato di apertura e chiusura della proteina. Il dominio regolatore citoplasmatico apre e chiude il canale su attivazione delle proteine chinasi. Il CFTR è in grado di regolare la funzione di altri canali ionici, ed in particolare quello del Na^+ , sul quale svolge un ruolo inibitorio.

L'AMPc ed il Ca^{2+} regolano anche i canali per il K^+ presenti sulla membrana apicale dei colonociti. Quelli attivati dal Ca^{2+} mantengono negativo il potenziale di membrana e sostengono la stimolazione della secrezione mediata dal Ca^{2+} .

Quando l'ingresso del Ca^{2+} si riduce, i canali Ca^{2+} -dipendenti diventano meno attivi. Tale situazione viene compensata dall'attivazione dei canali cAMP dipendenti e ripolarizzazione della membrana.

L'aumento della concentrazione intracellulare dell'AMPc ha effetti anche sulle cellule caliciformi, dove induce sintesi de novo di mucina e successiva secrezione. La stimolazione colinergica di queste cellule determina, invece, il rilascio di muco preformato. Agonisti, come il carbacolo e l'istamina, stimolano le cellule caliciformi a secernere muco, attraverso l'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} . Anche le prostaglandine possono stimolare il rilascio di muco,

L'AMPc è responsabile dell'induzione della secrezione di HCO_3^- . Secondo numerosi autori la secrezione elettrogenica del HCO_3^- nel colon è regolata dal canale CFTR (Seidler et al., 1997; Clarke & Harline 1998): questa attività contribuisce alla secrezione di Cl^- e al controllo del pH luminale ed intracellulare del colon (Kunzelmann & Mall 2002).

Un importante secretagogo è la prostaglandina PGE2 (metabolita dell'acido arachidonico, nonché mediatore infiammatorio), che si lega al proprio recettore, determinando la formazione di AMPc, che attiva la secrezione di Cl^- . È quindi il mediatore endogeno della secrezione di Cl^- . Al contrario, gli inibitori delle ciclossigenasi, come l'indometacina, impedendo la sintesi della PGE2, inibiscono la secrezione basale di Cl^- .

La secrezione di elettroliti e acqua, può essere indotta anche dai sali biliari idrofobici. Il taurodeossicolato (TDC) ha effetto pro-secretorio, inducendo la secrezione di Cl^- . Normalmente, a basse concentrazioni del TDC, aumenta l'ingresso di Ca^{2+} dal lato mucosale della cellula. Si ha un aumento della concentrazione intracellulare dello ione e l'attivazione dei canali per il K^+ Ca^{2+} -dipendenti presenti sulla membrana basolaterale. Il K^+ esce e la membrana si iperpolarizza; si attiva il cotrasportatore basolaterale $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, determinando l'ingresso di questi ioni nel citoplasma; attraverso i canali presenti sulla membrana apicale si realizza la fuoriuscita di K^+ e la secrezione di Cl^- .

L'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} e AMPc determina anche l'inibizione dell'assorbimento del Na^+ . L'assorbimento elettroneutro dello ione sodio, mediato principalmente dallo scambiatore Na^+/H^+ , è inibito dalla proteina chinasi C (PKC), dalla chinasi Ca^{2+} -calmodulina dipendente e dall'aumento dei livelli di AMPc. Quest'ultimo agisce anche inibendo l'assorbimento elettrogenico, mediato dall'ENaC, mentre si ha una contemporanea attivazione del canale CFTR.

Il canale CFTR, quindi, agisce sulle cellule delle cripte come un canale per il Cl^- regolato dall'AMPc, mentre sulle cellule dell'epitelio superficiale agisce regolando altre proteine di trasporto, come il canale ENaC e lo scambiatore Na^+/H^+ . Controlla perciò il trasporto ionico, determinando, in presenza di secretagoghi, il cambio della funzione delle cellule epiteliali dall'assorbimento alla secrezione. Inoltre, anche il GMPc può regolare i processi di secrezione. È

infatti stato ipotizzato che il GMPc porti ad un aumentata secrezione di Cl^- , mediante l'attivazione della PKG che, inibendo le fosfodiesterasi, comporterebbe un aumento dell'AMPc (Carbone E, 2009 ; Castano P, 2006).

3. MATERIALI E METODI

Nel presente lavoro sono stati valutati gli effetti del ceppo *Lactobacillus paracasei* L20 sulle cellule della mucosa intestinale del colon umano. Lo studio è stato effettuato utilizzando un modello *in vitro* che permette di avvicinarsi il più possibile alle condizioni fisiologiche che si realizzano *in vivo*. Il modello, rappresentato dalla mucosa intestinale di colon umano, è stato utilizzato con il dispositivo sperimentale definito “camera di Ussing”, mediante il quale è possibile riprodurre su campioni di tessuto isolato le condizioni normali di funzionamento e condurre sperimentazioni specifiche. In questo modello sono state valutate, in condizioni controllate, i meccanismi di trasporto ionico e di permeabilità della membrana e le loro variazioni a seguito dell’esposizione a diverse concentrazioni di batteri lattici.

Le attività principali svolte nel corso dello studio hanno riguardato:

- la preparazione di terreni di coltura e soluzioni fisiologiche
- la preparazione delle sospensioni batteriche da testare sul colon umano;
- la valutazione della carica batterica vitale delle sospensioni incubate con il colon nella camera di Ussing
- la preparazione delle soluzioni fisiologiche di incubazione (Krebs)
- il reperimento dei campioni di colon umano
- l’allestimento delle camere di Ussing
- la misura dei parametri elettrofisiologici
- la valutazione degli effetti dell’esposizione topica alle sospensioni batteriche.

Le attività sono state svolte presso i laboratori dell’ISPA CNR di Bari e del Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Scienze Farmacologiche dell’Università di Bari.

3.1. Preparazione delle colture batteriche

3.1.1 Ceppo batterico

Lo studio è stato condotto sul ceppo *L. paracasei* L20, presente nella collezione batterica dell’Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA). Questo ceppo è di origine umana ed è stato selezionato in studi precedenti per le sue proprietà probiotiche.

3. 1.1. Substrati di crescita

Il substrato “de Man Rogosa Scarpe” (MRS) è un terreno idoneo alla crescita dei batteri lattici. Nel corso del lavoro sono stati impiegati MRS liquido e solido rispettivamente per la preparazione delle sottocolture del ceppo e per la valutazione della carica batterica vitale delle sospensioni saggiate sui tessuti umani.

Il terreno MRS liquido, ha la seguente composizione:

Composti	Quantità
Peptone	10 g
Estratto di carne	10 g
Estratto di lievito	5 g
Glucosio	20 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Sodio acetato	5 g
Citrato diammonico	2 g
MgSO ₄	0,2 g
MnSO ₄	0,05 g
Tween 80	1 ml
Acqua distillata	1000 ml

MRS solido è ottenuto aggiungendo 16 g/l di agar all'MRS liquido.

Dopo sterilizzazione in autoclave a 121°C per 15 min, circa 15 ml di substrato sono stati aliquotati in piastre Petri di 10 cm.

MRS liquido contenente glicerolo al 20% è stato utilizzato per la conservazione del ceppo *L. paracasei* L20 a -80°C.

3.1.2. Soluzione salina di Krebs.

La soluzione di Krebs ha una composizione di soluti che riproduce quella dei liquidi interstiziali. La concentrazione ionica in mmol/l è: Na⁺ 67,91; K⁺ 2.25; Ca²⁺ 0.63; Mg²⁺ 0.50; Cl⁻ 58.2; HCO₃⁻ 12.50; H₂PO₄⁻ 0.10; H₂PO₄²⁻ 0.90; glucosio 6.00.

La soluzione di Krebs per gli esperimenti è stata preparata sciogliendo in acqua distillata i composti nelle quantità riportate in tabella e portando il volume finale ad 1 litro.

Composti	Concentrazioni mM	Quantità g/l
NaCl	107.00	6.254
KCl	4.50	0.336
NaHCO ³	25.00	2.100
Na ₂ HO ₄	1.80	0.256
NaH ₂ O ₄	0.20	0.024
CaCl ₂	1.25	0.184
MgCl ₂	1.00	0.204
Glucosio	12.00	2.162

Per evitare la formazione di precipitati i composti sono stati messi in soluzione seguendo scrupolosamente l'ordine dell'elenco sopra riportato, avendo cura di aggiungere ogni soluto solo quando quello precedente si era sciolto completamente e la soluzione si presentava limpida.

Nel corso della preparazione, la soluzione è stata posta su di un apposito agitatore, con l'utilizzo di una barretta magnetica per facilitare la soluzione dei sali.

Il pH della soluzione è stato portato al valore di 7.4 e tale operazione è stata effettuata due volte: dopo l'aggiunta dei primi tre composti e alla fine della preparazione. In questa maniera si evitava che i composti del calcio, aggiunti in un ambiente molto basico, precipitassero. Per l'aggiustamento del pH si aggiungeva un acido forte (HCl 2N), poiché il pH, dopo l'aggiunta dei soluti utilizzati, risultava essere basico.

La soluzione di Krebs preparata correttamente appariva limpida, trasparente, incolore e inodore.

3.1.3. Sospensioni batteriche di *L. paracasei* L20

Il ceppo *L. paracasei* L20 è stato fatto crescere in MRS liquido inoculato al 2% ed incubato a 37°C per 24 ore in anaerobiosi. La coltura di un giorno è stata sottoposta a centrifugazione per 10 min a 9000 rpm alla temperatura di 4 °C e a successivo lavaggio delle cellule in soluzione salina di Krebs. Dopo un'ulteriore centrifugazione nelle medesime condizioni e risospensione del pellet, la sospensione ottenuta è stata diluita fino a valori di densità ottica (OD) di 0,3 a 600 nm. Da questa sospensione sono state preparate 7 diluizioni seriali decimali in soluzione salina di Krebs allo scopo di ottenere sospensioni a diversa concentrazione da saggiare sui tessuti (figura 15). In particolare, nel corso dello studio è stato valutato l'effetto della sospensione iniziale, con valore di densità ottica pari a 0,3, e delle diluizioni 10⁻², 10⁻⁴ e 10⁻⁶ sul trasporto ionico della mucosa di colon umano.

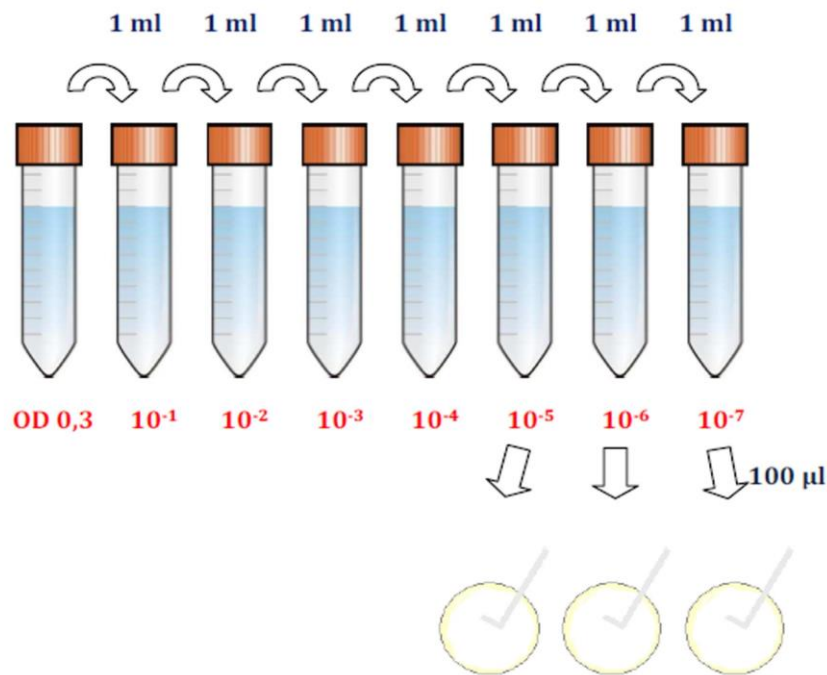


Figura 15. Preparazione delle diluizione e semina per spatolamento superficiale.

Inoltre, al fine di accertare la carica vitale della sospensione iniziale, tre aliquote di 0,1 ml di ognuna delle tre diluizioni 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} sono state inoculate separatamente sulla superficie di tre piastre di MRS. L'inoculo è stato distribuito uniformemente con l'ausilio di un'ansa ad L. Le piastre sono state incubate a 37°C in anaerobiosi.

Dopo 48 ore di incubazione è stato eseguito il conteggio delle colonie nelle piastre che ne contenevano un numero compreso tra 30 e 300, al fine di eseguire un conteggio più accurato. Da questo conteggio, corretto in base al fattore di diluizione, è stato possibile risalire alla carica batterica vitale presente nella sospensione iniziale, espressa come Unità Formanti Colonie (UFC) per ml di sospensione, e della carica batterica presente nelle diluizioni preparate da essa.

La sospensione iniziale, avente OD 0,3, presentava una carica vitale pari a $2 \cdot 10^8$ UFC/ml. Di conseguenza le diluizioni 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} impiegate negli esperimenti avevano rispettivamente una densità pari a $2 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^4$ e $2 \cdot 10^2$ UFC/ml.

3.1.3. Verifica post-esperimento delle diluizioni batteriche

Le soluzioni mucosali contenenti *L. paracasei* L20 alle diverse densità sono state sottoposte, al termine di alcuni esperimenti, alla verifica della vitalità del ceppo nelle condizioni sperimentali adottate mediante semina per spatolamento superficiale, come descritto in precedenza.

Il conteggio delle UFC nelle piastre di MRS dopo 48 ore di incubazione ha permesso di risalire alla carica batterica vitale presente nelle camere di Ussing durante l'esperimento. Tutte le sospensioni risultavano avere una carica vitale uguale a quella presente all'inizio degli esperimenti, corrispondente a $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^6$ e $2 \cdot 10^8$ UFC/ml.

Le colonie del ceppo su MRS si presentavano di forma tondeggiate, regolare e di colore bianco (Figura16)



Figura 16. Colonie batteriche su piastra Petri

3. 2. Misure bioelettriche in camera di Ussing.

3. 2. 1. Reperimento dei campioni di colon

I campioni di tessuto sono stati forniti dalle sezioni di chirurgia del Policlinico di Bari e prelevati dalla mucosa intestinale di soggetti presentanti patologie tumorali o poliposi sottoposti ad intervento chirurgico di colectomia subtotale per la rimozione del pezzo d'organo interessato dalla patologia (cieco, colon destro, colon sinistro, sigma e retto). Dopo l'intervento sono state prelevate porzioni di mucosa macroscopicamente normale, situate ad una distanza di circa 10 cm dalla massa tumorale rimossa. Subito dopo il prelievo, il tessuto, consistente in anelli di mucosa larghi circa 1 cm, è stato posto nel tampone costituito dalla soluzione salina di Krebs era messo in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo. I campioni non saggiati nella stessa giornata del prelievo, sono stati conservati O/N alla temperatura di 4°C e utilizzati il giorno seguente.

Nel corso dello studio sono stati valutati i parametri bioelettrici dello strato mucosale dei campioni, mediante la camera di Ussing, e l'effetto del ceppo *L. paracasei* L20 sugli stessi.

3. 2. 2. Misure bioelettriche

Come già visto, le cellule epiteliali sono cellule polarizzate, per via della differente distribuzione delle proteine di membrana sulla superficie apicale/mucosale, rivolta verso il lume epiteliale, e sulla superficie basolaterale, rivolta verso la membrana basale.

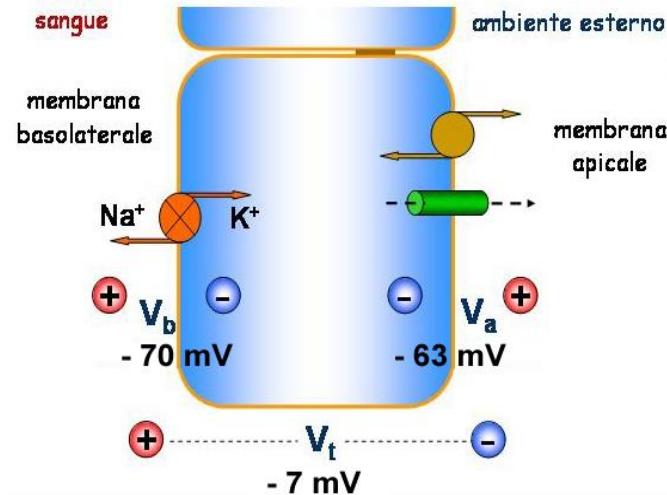


Figura 17. Modello di formazione dei potenziali elettrici di membrana e del potenziale transepiteliale.

Queste cellule sono strettamente collegate fra loro, grazie a sistemi giunzionali, e separano l'ambiente del lume intestinale da quello dei liquidi extracellulari (il plasma ed il liquido interstiziale). Grazie alla loro polarità, la mucosa del colon può svolgere un ruolo specifico di assorbimento e/o secrezione ed è in grado di regolare scambi di acqua, elettroliti e molecole. Le funzioni dell'epitelio intestinale includono, infatti, i trasporti ionici, volti a mantenere l'omeostasi idrica e salina dell'organismo. Il trasporto attraverso la membrana delle molecole cariche elettricamente si realizza per mezzo dei canali ionici, grazie ai gradienti di concentrazione e alla differenza di potenziale della membrana. Quest'ultima è generata dall'asimmetria ionica tra citoplasma ed interstizio e viene mantenuta dall'attività della pompa Na^+/K^+ -ATPasi, presente sulla membrana basolaterale degli enterociti. Inoltre l'assorbimento e la secrezione netta degli ioni genera polarizzazione transepiteliale e, quindi, lo stabilirsi di un potenziale elettrico transepiteliale (V_{ms}) tra lato luminale e sierosale.

A cavallo della membrana (sia dalla parte mucosale sia dalla parte basolaterale) si genera una differenza di potenziale, che rende la membrana polarizzata negativamente sul versante interno. Da un punto di vista elettrico, queste due membrane sono in serie fra loro, così come i loro potenziali V_m e V_s . Per questo motivo il potenziale transepiteliale (V_{ms}) è dato dalla loro

somma algebrica: $V_{ms}=V_m+V_s$, ed ha la polarità del potenziale di membrana più elevato.

Ioni ed altre sostanze possono attraversare l'epitelio per via transcellulare, attraverso le resistenze della membrana esterna e di quella interna, oppure per via paracellulare, attraverso la resistenza offerta dalle giunzioni fra cellule.

Da un punto di vista elettrico le vie di permeazione attraverso la membrana mucosale, sierosale e attraverso le tight junctions, sono rappresentate rispettivamente dalle resistenze R_m , R_s e R_{sh} (shunt paracellulare), dove R_m ed R_s sono poste in serie ad una pila, che rappresenta il potenziale della membrana mucosale e sierosale (rispettivamente E_m ed E_s).

Figura 18. Modello elettrico di cellule epiteliali

Nella figura sono evidenziate le VIE DI PERMEAZIONE:

R_m : trasporti membrana mucosale (m);

R_s : trasporti membrana sierosale (s);

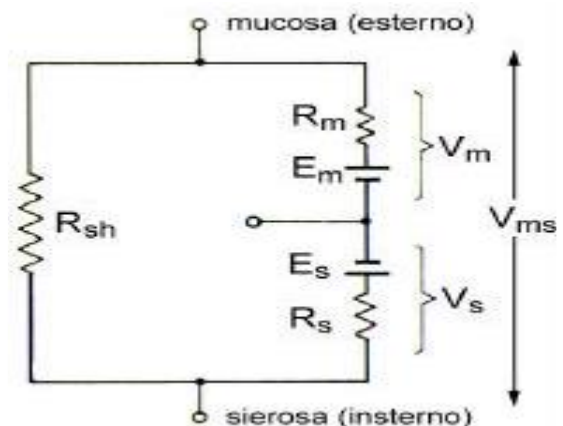
R_{sh} : shunt paracellulare (tj/gj)

ed i POTENZIALI DI MEMBRANA:

V_m : potenziale mucosale;

V_s : potenziale sierosale;

V_{ms} : potenziale transepiteliale



I parametri elettrici sono dovuti alla risultante delle attività di trasportatori e canali, attraverso i quali si realizza il passaggio di molecole cariche, che determinano le variazioni del potenziale di membrana.

Per questi motivi, per studiare i meccanismi di trasporto molecolare attraverso l'epitelio, risulta molto utile la misura del potenziale transepiteliale e delle resistenze epiteliali. A questo scopo si usa la camera di Ussing.

3. 2. 3. La camera di Ussing

La "camera di Ussing", o camera per la misura dei flussi ionici negli epitelii isolati, è un dispositivo sperimentale, perfezionato da Hans Ussing nel 1950. È utilizzato per effettuare misure bioelettriche e valutare così l'attività dell'epitelio in termini di trasporto ionico. Per mezzo della camera di Ussing si può effettuare un continuo monitoraggio dei parametri elettrici e, in modo particolare, la misura costante della differenza di potenziale (d. d. p.) epiteliale. Questa fornisce indicazioni circa il flusso ionico transepiteliale.

Tale dispositivo consta di due emicamere, che vengono assemblate ponendo al centro il tessuto oggetto di studio. L'epitelio in questione forma un setto a separare i due compartimenti: quello mucosale (CM) e quello sierosale (CS).

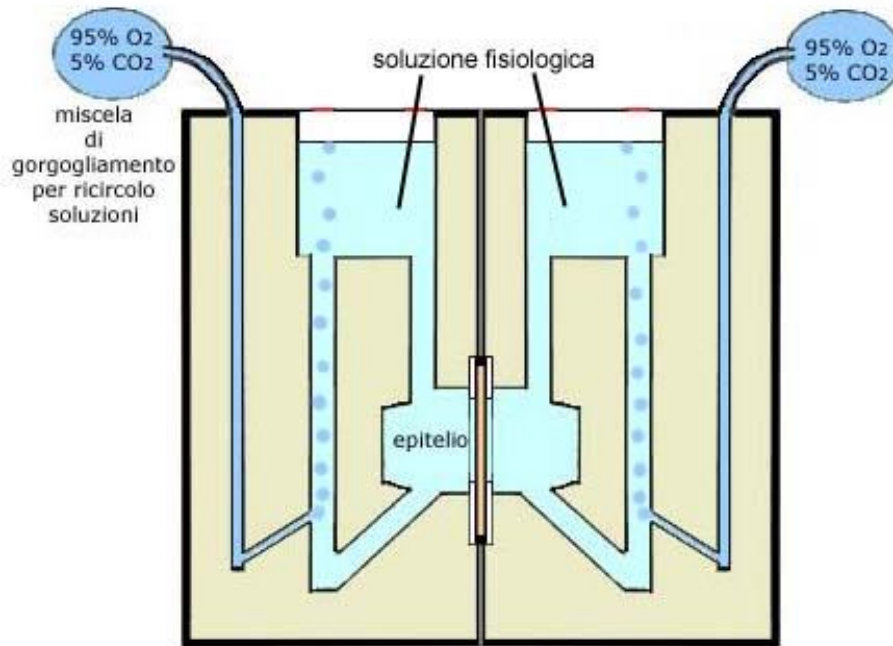


Figura 19. Schema della camera di Ussing: due emicamere speculari; al centro il tessuto che forma un setto; soluzione fisiologica in ciascuna emicamera; canale per il gorgogliamento della miscela di carbossigeno.

Il tessuto isolato è mantenuto in vita grazie alla soluzione salina di krebs, con composizione simile a quella plasmatica, e al gorgogliamento di una miscela gassosa di carbossigeno (95% di O₂ + 5% di CO₂). In tal modo il tessuto riceve ossigeno, così come accade *in vivo* grazie all'irrorazione ematica. Inoltre, il gorgogliamento mantiene omogeneo ed in continuo movimento il contenuto delle camere, evitando che sulla superficie del tessuto si formino gradienti ionici dovuti al trasporto cellulare.

In questo modo l'epitelio isolato dall'organo può sopravvivere e funzionare.

Sebbene nel caso dell'epitelio intestinale, il compartimento mucosale è rappresentato dal contenuto del digerente, nel dispositivo di Ussing entrambe le emicamere vengono riempite con la soluzione di Krebs. In questo modo si evitano movimenti passivi di ioni, generati dalle asimmetrie nella composizione ionica, permettendo di evidenziare esclusivamente i trasporti specifici, attivamente prodotti dall'epitelio. Il potenziale transepiteliale è il risultato dell'esclusiva attività di trasporto intrinseca del tessuto.

Con la camera di Ussing è possibile misurare i seguenti parametri elettrofisiologici:

- differenza di potenziale transepiteliale (dP);
- corrente di cortocircuitazione (I_{cc});
- resistenza transepiteliale (R_t).

Il *potenziale transepiteliale* (dP) viene misurato grazie alla presenza di una coppia di elettrodi reversibili, posti ciascuno in un emicamera e collegati ad un voltmetro.

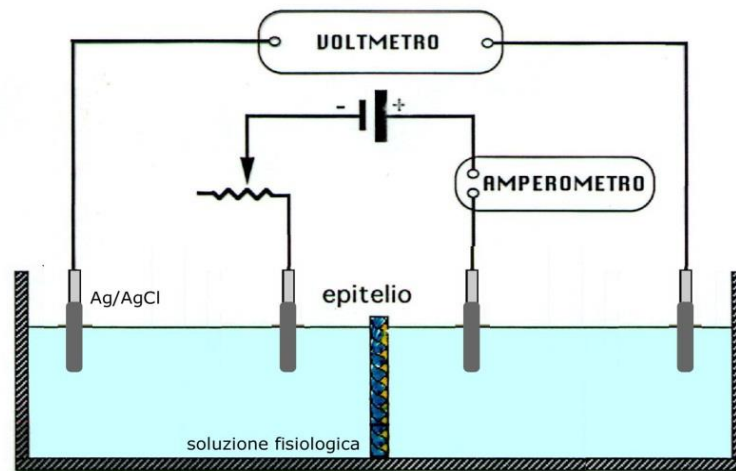


Figura 20. Schema del circuito di principio utilizzato nella camera di Ussing per la determinazione del potenziale transepiteliale e della corrente di cortocircuito

La *corrente di cortocircuitazione* (I_{cc}) è indice del flusso ionico attraverso la membrana e viene rilevata grazie ad un'ulteriore coppia di elettrodi, entrambi collegati ad un generatore di corrente. Mediante questo generatore si può erogare corrente in senso opposto al trasporto ionico generato dall'epitelio, di intensità tale da annullarlo e quindi da azzerare il potenziale rilevato dal voltmetro. Questa corrente corrisponde all'entità del trasporto ionico attivo transepiteliale.

Tra tutti i trasporti effettuati da un epitelio, quelli di alcuni ioni prevalgono e sono questi a costituire il trasporto netto dell'epitelio considerato rilevabile mediante la corrente di cortocircuito.

Mentre il potenziale è indice indiretto e non preciso del trasporto attivo, la corrente di cortocircuito ne è misura diretta.

La *resistenza transepiteliale* (R_t) è data dalla resistenza che l'epitelio oppone al passaggio della corrente. Poiché il passaggio della corrente determina una variazione del potenziale transepiteliale proporzionale alla resistenza dell'epitelio, questa si può misurare indirettamente, servendosi della legge di Ohm:

$$V_t = I_{ionica} \cdot R_t$$

Dove V_t è il potenziale transepiteliale; R_t la resistenza dell'epitelio; I_{ionica} la corrente prodotta dal trasporto ionico attraverso il tessuto, ossia la corrente di cortocircuitazione I_{cc} . Pertanto applicando la formula inversa otteniamo R_t :

$$R_t = \frac{V_t \cdot \text{superficie epitelio}}{I_{cc}}$$

Dimensionalmente: $[\text{Ohm} \cdot \text{cm}^2] = [\text{mV}] * [\text{cm}^2] / [\mu\text{A}]$

La *resistenza transepiteliale* dà informazioni sulla vitalità del tessuto e sulla permeabilità dell'epitelio: se l'attività di trasporto è intensa e vi sono quindi molti canali aperti, la R_t misurata sarà inferiore rispetto a quella misurata nello stesso tessuto in condizioni di basso trasporto ionico.

Il *flusso ionico* è ricavato dall'equazione:

$$\Psi_{ione} = \frac{I_{cc} \cdot 3600}{96500 \cdot \text{superficie}}$$

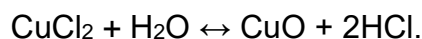
Dove 3600 sono *sec/h*, fattore necessario per riportare il flusso ad 1 ora; 96500 è la costante di Faraday, espressa in *coulomb/mol*, che rappresenta la carica di una mole di ioni e permette di trasformare l'intensità di corrente in numero di cariche.

Da un punto di vista dimensionale il flusso ionico è espresso come $\mu\text{Eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ (Cremaschi & Esposito).

Nella pratica sperimentale, in realtà, poiché il flusso è direttamente proporzionale alla I_{cc} per unità di superficie, i dati relativi al trasporto vengono espressi ed analizzati direttamente come valori di corrente di cortocircuito.

Gli elettrodi utilizzati nella camera di Ussing sono elettrodi reversibili: dispositivi nei quali le specie chimiche in soluzione possono donare o accettare elettroni mediante reazioni redox con un conduttore metallico. Così il segnale chimico si trasforma in un segnale elettrico, un flusso di elettroni, che genera una corrente elettrica di intensità pari al numero di cariche ioniche che reagiscono con il conduttore metallico.

Con questi elettrodi si supera il problema in cui si incorre quando si utilizzano strumenti elettrici per misurare differenze di potenziale generate dal movimento di ioni. Infatti, nel circuito elettrico metallico i conduttori sono conduttori di prima specie, ossia elettroni che si muovono nel reticolo metallico; nelle soluzioni elettrolitiche i conduttori sono conduttori di seconda specie attraversati da corrente, cioè specie ioniche in movimento. La misura del potenziale epiteliale, inserendo dei conduttori metallici nelle soluzioni a contatto con i due lati dell'epitelio, è teoricamente possibile. In questo modo però i conduttori di rame andrebbero incontro a reazioni redox, originando cloruro rameoso (CuCl) e cloruro rameico (CuCl_2). Sciogliendosi in soluzione, il primo potrebbe danneggiare le giunzioni cellulari, mentre il secondo genererebbe ossido di rame (CuO) e acido cloridrico (HCl) secondo la reazione:



In questo modo il potenziale redox dell'elettrodo di rame risulterebbe instabile, alterando la misura della d. d. p. del tessuto.

Un esempio di elettrodo reversibile è quello di “argento/argento cloruro”, dove un filo di argento è ricoperto da una patina di sale AgCl. Questo è reso possibile mediante galvanostegia: il filo d’argento è collegato al polo positivo di un generatore, mentre al polo negativo è collegato un filo di platino o una barretta d’Ag; questi vengono immersi in una soluzione 0, 1 N di HCl; viene applicata una corrente, al cui passaggio il Cl⁻ in soluzione reagisce con l’argento del filo, che si ricopre quindi di AgCl. Questi elettrodi, immersi in una soluzione elettrolitica contenente Cl⁻ e collegata ad una sorgente di corrente, per via del movimento degli elettroni nel circuito, vanno incontro a clorurazione e decolorazione dell’argento sulla superficie degli elettrodi stessi, secondo la reazione indicata in figura 23. In questo modo, il movimento dell’elettrone che scorre nel filo elettrico, viene trasformato nel movimento di uno ione Cl⁻ nella soluzione elettrolitica, e viceversa.

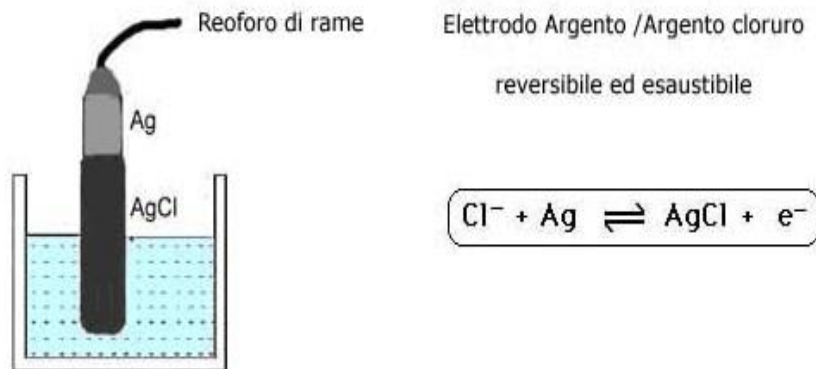


Figura 21. Elettrodo reversibile ed esaustibile Ag/AgCl

Per l’elettrodo Ag/AgCl è ideale l’immersione in soluzione satura di KCl, o direttamente in soluzione salina, poiché il rilascio di Ag è trascurabile e non determinerebbe la morte del tessuto. Lo stesso elettrodo può essere utilizzato per l’erogazione della corrente, evitando di erogare la corrente sempre nello stesso senso, in quanto l’elettrodo collegato al polo negativo tenderebbe a perdere ioni Cl⁻ e ad esaurirsi, mentre l’argento andrebbe in soluzione e altererebbe i proteinati di membrana. In questo caso gli elettrodi andrebbero posti in una soluzione satura di KCl e collegata a quella di incubazione con ponti Agar-soluzione di incubazione.

Per ovviare a questi inconvenienti sarebbe meglio utilizzare, per apparecchiature che erogano corrente sempre nello stesso senso, gli elettrodi di platino irreversibili; gli elettrodi Ag/AgCl potrebbero invece essere impiegati in quelle apparecchiature dotate di un sistema che eroga corrente alternata o di un sistema che alterna in sequenza la polarità della corrente erogata.

3. 2. 4. Allestimento del preparato

Lo strato mucosale dell'epitelio, prelevato a seguito dell'operazione chirurgica e conservato in soluzione di Krebs, è stato posto in una capsula Petri, contenente anch'essa soluzione di Krebs e aerata con una miscela di carbossigeno. Il flusso di carbossigeno (95% di O₂ + 5% di CO₂), oltre a rifornire di ossigeno i tessuti, ha anche la funzione di evitare alterazioni del pH. Infatti in soluzioni saline, ricche di bicarbonati, come quella di Krebs, si libera facilmente anidride carbonica, che può comportare dei cambiamenti nella concentrazione idrogenionica.



Figura 22. *Mucosa intestinale posta in capsula Petri, contenente soluzione di Krebs, sotto ossigenazione; pinzette e forbici utilizzati per pulizia e montaggio del tessuto.*

La soluzione di Krebs presenta composizione simile a quella ematica che è stata preparata utilizzando i componenti elencati nella sezione iniziale di questo capitolo, riguardante i materiali utilizzati per i vari esperimenti.

Lo strato di tessuto è stato accuratamente ripulito da tutto quello che non rappresenta la mucosa. Quindi, servendosi di pinzette e forbici, sono stati rimossi gli eventuali vasi presenti, prestando attenzione a non danneggiare la mucosa stessa. Una volta ripulita, la mucosa è stata montata nella camera di Ussing (modello di camera di Ussing prodotta dalla K. Mussler Scientific Instrument di Aachen – Germania).

Le due emicamere sono in polimetilmetacrilato, dotate di una finestra circolare (o ovale) centrale, attorno alla quale, su una delle due emicamere, si trovano delle piccole punte metalliche, che permettono l'ancoraggio della mucosa.

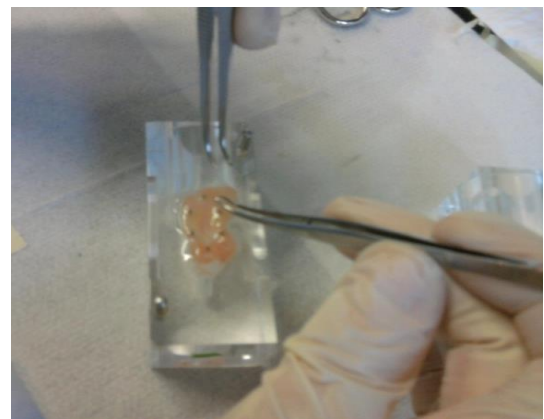


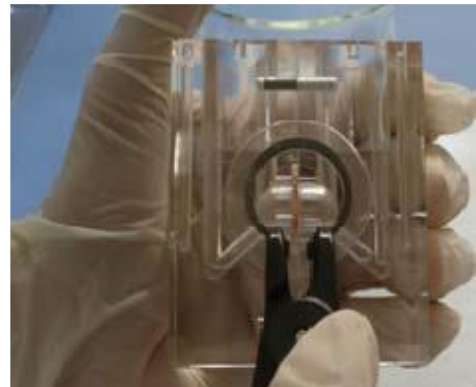
Figura 23. *Particolari del montaggio del tessuto sulla finestra dell'emicamera dotata di piccole punte metalliche.*

Questa è stata montata con il lato mucosale rivolto verso l'alto, in modo da far distendere le sue pliche e da ricoprire la superficie della finestra della cameretta (superficie di 1 cm²) con uno strato omogeneo di tessuto. Le due emi-camere sono state infine assemblate e fissate mediante un anello elastico.

Figura 24. Parti componenti la camera di Ussing: Camera assemblata; Emicamera separata; Guarnizione per sigillare l'epitelio; Anelli elastici di fissaggio; Pinza per gli anelli elastici

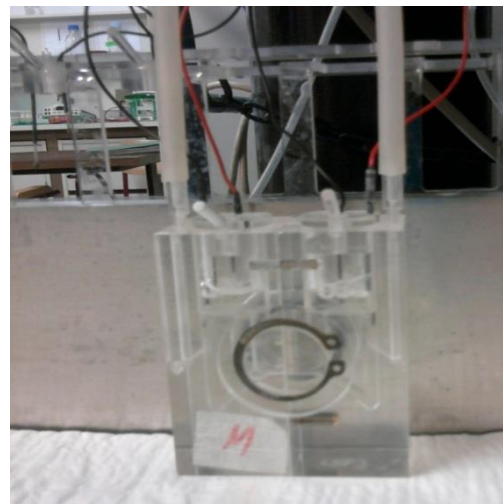


Figura 25. Particolare del fissaggio delle due emicamere mediante l'anello elastico di acciaio e l'apposita pinza.



Dopo aver montato il tessuto come illustrato, in entrambi i compartimenti della camera sono stati messi 3 ml di soluzione salina di Krebs. La soluzione è stata costantemente ricircolata e ossigenata grazie al sistema di gorgogliamento, alimentato con la miscela gassosa di carbossigeno, sfruttando il movimento ascensionale delle bolle d'aria. La camera è stata poi collegata tramite elettrodi reversibili posti in opportuni supporti ad un sistema computerizzato per la misurazione dei parametri elettrofisiologici visti. Per comodità le camere sono state sempre posizionate con il versante mucosale alla sinistra dell'operatore ed il versante basolaterale alla sua destra.

Figura 26. Particolare della camera di Ussing collegata agli elettrodi e ai tubi per il gorgogliamento della miscela di carbossigeno.



3. 2. 5. Sistema e procedure di misura

Come detto precedentemente, lo scopo degli esperimenti è stato quello di valutare in condizioni controllate, i meccanismi di trasporto ionico, dovuti agli effetti dei *Lattobacilli Paracasei* delle specie L20 ed L4 sulla mucosa di colon umano.

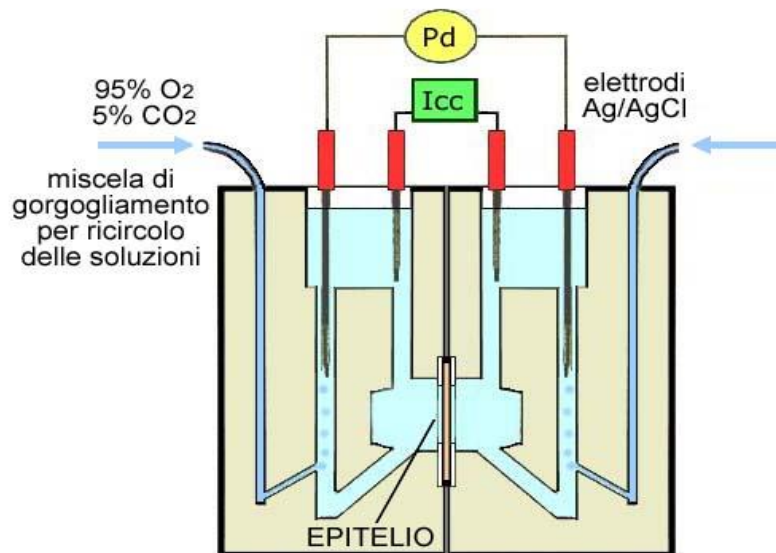


Figura 27. Schema funzionale della camera di Ussing utilizzata negli esperimenti per la misura del potenziale transepiteliale (Pd), della corrente di cortocircuito (I_{cc}) e della resistenza transepiteliale (R_t)

Nella camera di Ussing le due coppie di elettrodi Ag/AgCl sono connesse al sistema di acquisizione dati e pescano nella soluzione interna a ciascun compartimento. Gli elettrodi di rivelazione consentono di misurare il potenziale transepiteliale, mentre gli elettrodi per l'erogazione della corrente di cortocircuito consentono di determinare la resistenza transepiteliale e la corrente di cortocircuito. Entrambe le coppie di elettrodi sono connesse, attraverso un sistema adattatore, all'interfaccia del sistema rivelatore, a sua volta connesso al computer.

Il sistema di acquisizione dei dati consiste nel "Software Clamp" per personal computer e di un'interfaccia controllata da un microprocessore. Il microprocessore permette l'utilizzo contemporaneo ed indipendente di 6 camere di Ussing.

Computer ed interfaccia scambiano i dati attraverso una connessione seriale. Per ogni camera vi è un convertitore analogico-digitale ed un generatore per l'invio della corrente di cortocircuito. Sul monitor è possibile visualizzare numericamente, per ciascuna camera, i valori ottenuti mediante le misure della resistenza del tessuto R_t (Ohm cm^2); del potenziale transepiteliale dP (mV) e della corrente di cortocircuito I_{cc} ($\mu\text{A/cm}^2$). Per poter visionare rapidamente i

risultati i dati sono conservati nella memoria temporanea, ma ogni 10 minuti vengono salvati automaticamente sul disco rigido. L'esperimento può avere durata massima di otto ore. Al termine dell'esperimento i dati vengono salvati sul disco rigido in maniera definitiva.

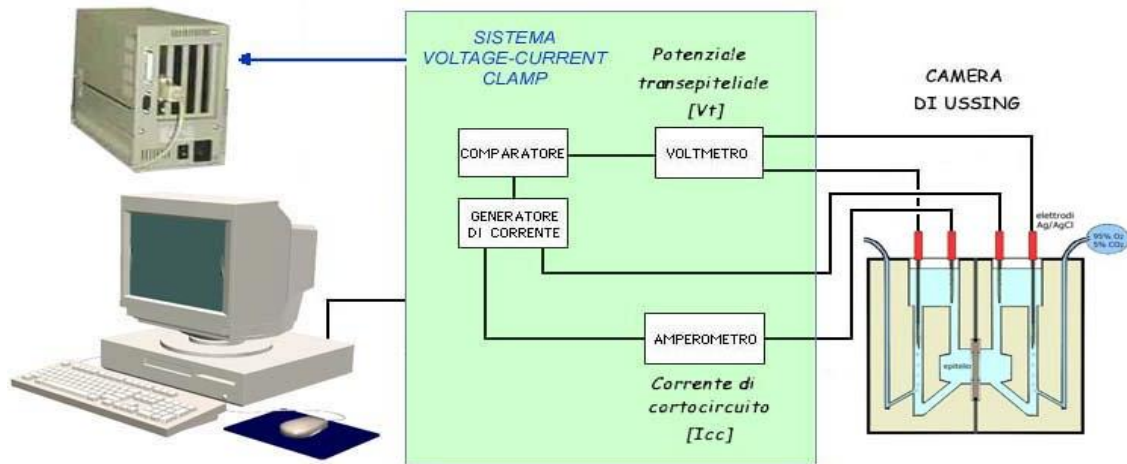


Figura 28. Rappresentazione delle connessioni funzionali della camera di Ussing alla strumentazione, per la misura dei parametri elettrofisiologici

Negli esperimenti con le camere di Ussing si procede avviando sul computer il programma "Clamp", dal quale si selezionano le camere di Ussing sulle quali si desidera effettuare le misurazioni.

La prima fase dell'esperimento consiste nel settaggio di ciascuna camera, ovvero la taratura del sistema di misura. In questa fase le camere vengono allestite senza epitelio e riempite con 4 ml di soluzione di Krebs per emicamera.

Con il settaggio si valuta la *resistenza del fluido* (R_f) e il *potenziale proprio degli elettrodi* (dPe). Il *potenziale o asimmetria degli elettrodi* è tipico degli elettrodi reversibili, dotati ciascuno di caratteristiche elettriche differenti, per motivi di costruzione. Se i due elettrodi fossero identici dPe sarebbe pari a zero, mentre sono accettabili valori compresi fra $\pm 1,5$ mV, perché il valore di d.d.p. misurato possa essere considerato corretto. Tale valore viene poi sistematicamente aggiunto o sottratto ad ogni lettura. La *resistenza del fluido* generalmente deve essere vicino ai 600-700 Ohm e dipende dalla composizione della soluzione fisiologica. Anche questo valore, una volta rivelato nella fase di taratura, viene sistematicamente sottratto ad ogni misurazione.

Terminata la fase di taratura o settaggio, si procede all'allestimento delle camere con i tessuti ed al collegamento con gli elettrodi, operando come già descritto. A questo punto per ciascuna camera si può avviare l'acquisizione di dati.

La lettura dei parametri transepiteliali, quali dP ed R_t , viene effettuata nella modalità di misura "Open Circuit", mentre quella della corrente di cortocircuito (I_{cc}) in modalità "Voltage Clamp". Le due modalità vengono selezionate attraverso l'uso del "Software Clamp". Le rilevazioni vengono effettuate ogni 6 secondi.

Viene misurata la dP generata spontaneamente dall'epitelio per effetto dei trasporti ionici attivi e passivi, che hanno luogo sulle membrane apicali e basolaterali. In entrambe le modalità di misura, ciclicamente, ad intervalli di un minuto, l'apparecchio eroga un impulso bipolare (per evitare la polarizzazione degli elettrodi) di corrente costante, intensità di 500 μA e durata di 200 msec. L'erogazione di questa corrente di valore prestabilito (I_R) genera una variazione di potenziale (ΔdP), che consente di calcolare la resistenza transepiteliale R_t , mediante la formula:

$$R_t = \frac{\Delta dP \cdot \text{superficieepitelio}}{I_R}$$

Inizialmente le misure hanno lo scopo di valutare l'integrità funzionale del tessuto: valori di dP pari a 0 mV e di R_t pari ad 1 Ohm·cm² indicano la presenza di qualche lesione. Inoltre, è opportuno dare al tessuto il tempo necessario perché si stabilizzi dopo gli stress di dissezione e montaggio subiti nelle fasi precedenti. Si preferisce così aspettare alcuni minuti, finché i valori dei parametri misurati (dP ed R_t) risultano costanti.

Il circuito viene mantenuto aperto fino a quando i valori di dP rilevati nell'arco di 5 minuti sono pressoché uguali. In questa prima parte la corrente di cortocircuito (I_{cc}) è pari a 0. Superata questa fase si può avviare la modalità "Voltage Clamp", o blocco del voltaggio, che fissa il potenziale al valore di 0 mV, permettendo di ottenere così la I_{cc} . Viene erogata una corrente che porta il dP al valore di blocco, corrispondente al potenziale impostato, cioè a 0 mV. La corrente erogata (I_{cc}), espressa in $\mu A/cm^2$, non è altro, come già visto, che una misura del trasporto netto di ioni attraverso l'epitelio. I tessuti vengono mantenuti in tale modalità per non più di 30 secondi, tempo sufficiente ad annullare il potenziale e, oltre al quale, si potrebbe provocare un danno al tessuto, che reagirebbe modificando le proprie caratteristiche. Al termine del "Voltage Clamp" si ripristina la modalità "Open Circuit".

Nei nostri esperimenti il "Voltage Clamp" è stato ripetuto ad intervalli di 5 minuti, per 6 volte, ossia per un tempo pari a 30 minuti. Terminata questa fase, detta di stabilizzazione, si è proceduto con l'aggiunta della sostanza da testare.

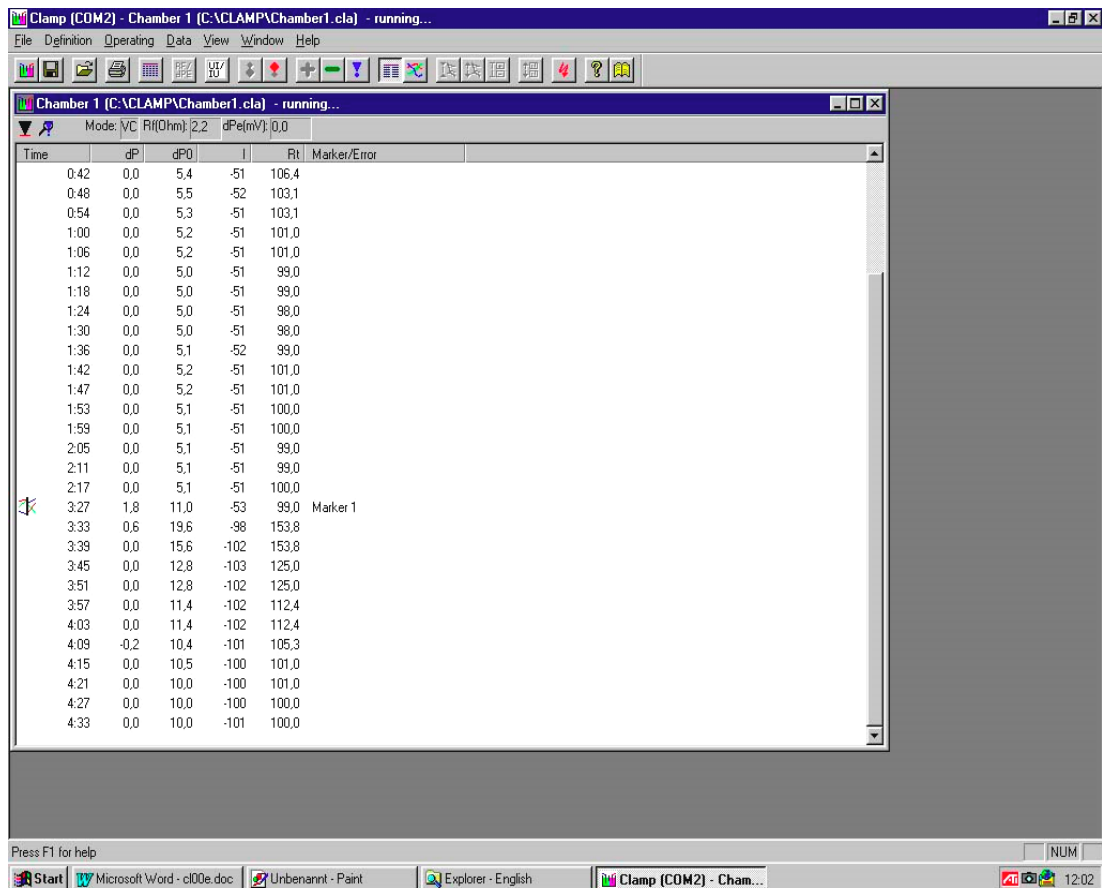


Figura 29. Videata della finestra del rilevamento dati

3.3. Analisi statistica

I dati dei parametri elettrofisiologici rilevati in ogni esperimento tramite il sistema Voltage Clamp, venivano riportati in fogli di calcolo del programma Office Excel. Questo programma è in grado, attraverso impostazione precedente di formule, di calcolare in modo automatico i valori medi e l'errore standard del potenziale e della corrente transepiteliale oltre a quello della corrente di cortocircuito, nei gruppo di esperimenti condotti con lo stesso protocollo. Questi valori permettono di rappresentare graficamente il decorso temporale delle variazioni dei parametri funzionali complessivamente osservate per un certo tipo di protocollo.

In questi foglio di calcolo, è inserita anche la formula per il calcolo della probabilità p secondo il test del t di Student. Con questa analisi condotta per dati appaiati o non appaiati a due code, è possibile valutare la significatività statistica dell'effetto della sostanza studiata, confrontando i valori dei parametri rilevati durante il trattamento, con quelli rilevati durante il periodo di controllo.

Sono state ritenute statisticamente significative le differenze per le quali p assumeva valori inferiori a 0,05.

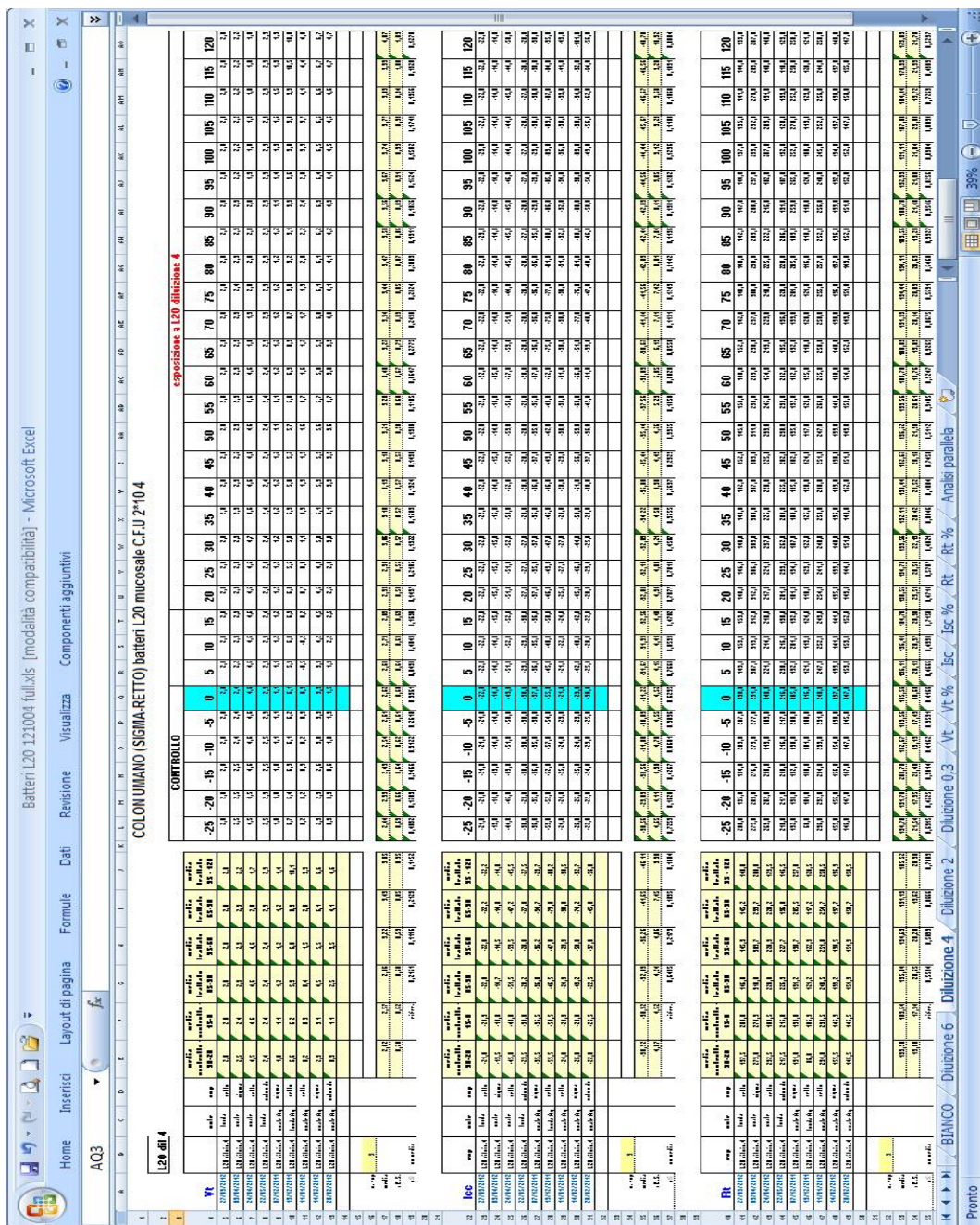


Figura 30. Foglio di calcolo per l'analisi dei dati rilevati in gruppo di esperimenti con medesimo protocollo. Sono impostate le formule per il calcolo dei valori medi e dell'errore standard dei tre parametri elettrofisiologici analizzati, nonché il calcolo del "p" per il t-test.

I valori medi ottenuti per ciascuno dei parametri analizzati sono stati, infine, riportati in opportuni grafici.

Per facilitare l'analisi e la presentazione grafica dei risultati complessivi, i dati sono stati raggruppati in valori medi dei dati rilevati in intervalli di 30 minuti prima e dopo il trattamento.

I valori sono stati infine trasformati in variazioni % attribuendo il valore di 100% al valore medio rilevato prima del trattamento.

Il test del t è stato condotto tra tutte le condizioni sperimentali in maniera incrociata prevedendo l'uso negli istogrammi della seguente simbologia grafica:

- t-test per dati appaiati in ciascun gruppo vs dati ottenuti al tempo t=0 (*: $\leq 0,05$);
- t-test, per dati non appaiati, tra tessuti trattati vs tessuti di controllo (\circ : $\leq 0,05$);
- t-test per dati non appaiati vs tessuti trattati con la sospensione batterica a CFU $2 \cdot 10^2$ (diluizione 6) (§: $\leq 0,05$);
- t-test per dati non appaiati vs tessuti trattati con la sospensione batterica a CFU $2 \cdot 10^4$ (diluizione 4) (§: $\leq 0,05$);
- t-test per dati non appaiati vs tessuti trattati con la sospensione batterica a CFU $2 \cdot 10^6$ (diluizione 2) (§: $\leq 0,05$);
- t-test per dati non appaiati vs tessuti trattati con la sospensione batterica a CFU $2 \cdot 10^8$ (diluizione con OD 0,3) (§: $\leq 0,05$);

4. RISULTATI

Come già espresso in precedenza lo scopo prioritario della presente tesi è consistito nella valutazione degli effetti del ceppo probiotico *Lactobacillus paracasei* L20, sui meccanismi di trasporto ionico intestinale.

Il modello sperimentale umano era rappresentato da campioni di mucosa, prelevate da vari tratti del colon: colon destro, sigma e retto.

I campioni di tessuto sono stati forniti dalle sezioni di chirurgia del Policlinico di Bari e prelevati dalla mucosa intestinale di soggetti presentanti patologie tumorali o poliposi, sottoposti ad intervento chirurgico di colectomia subtotale per la rimozione del pezzo d'organo interessato dalla patologia (cieco, colon destro, colon sinistro, sigma e retto).

Dopo l'intervento venivano prelevate porzioni di mucosa macroscopicamente "normale", ad una distanza di circa 10 cm dalla massa tumorale rimossa. Sono stati esclusi i tessuti provenienti da pazienti dopo trattamento anti-infiammatorio o radioterapia.

I campioni non utilizzati nella stessa giornata del prelievo, erano conservati in soluzione di Krebs alla temperatura di 4°C e utilizzati il giorno seguente.

Per il seguente studio è stato utilizzato il dispositivo sperimentale definito "*camera di Ussing*", che permette di riprodurre, su campioni di tessuto isolato, le normali condizioni di funzionamento e quindi di effettuare sperimentazioni specifiche.

Nel corso dello studio sono stati valutati i parametri bioelettrici in condizioni di controllo e durante l'esposizione a sospensioni di *L. paracasei* L20 in concentrazioni comprese tra $2 \cdot 10^2$ e $2 \cdot 10^8$ UFC/ml.

4.1. Valori basali dei parametri funzionali

I parametri elettrici di un epitelio rappresentano un indice della funzionalità del tessuto, in quanto esiste una diretta correlazione tra differenza di potenziale, corrente di cortocircuito e trasporto ionico, così come la resistenza transepiteliale rappresenta un indice dell'integrità dell'epitelio e delle sue giunzioni paracellulari.

I parametri elettrici transepiteliali rilevati erano: differenza di potenziale (V_t), corrente di corto circuito (I_{cc}) e resistenza transepiteliale (R_t).

Per gli esperimenti effettuati per questo lavoro di tesi sono stati utilizzati 45 campioni di colon prelevati da un totale di nove pazienti, secondo quanto riportato nella tabella seguente.

TRATTO	TESSUTI	CAMPIONI
Colon destro	2	10
Sigma	3	15
Retto	4	20

I valori basali dei parametri elettrofisiologici, espressi sempre come valori medi delle misurazioni effettuate 25 min dopo che i parametri si erano stabilizzati, e quindi prima dell'inizio del trattamento con le sospensioni batteriche, erano i seguenti:

	Colon destro	Sigma	Retto	
Potenziale transepiteliale (V_t)	$2,6 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$	mV
Resistenza transepiteliale (R_t)	$185,2 \pm 5,4$	$182,2 \pm 7,7$	$185,1 \pm 5,9$	Ohm·cm ²
Corrente di cortocircuito (I_{cc})	$-29,7,8 \pm 0,8$	$-27,53 \pm 1,1$	$-30,5 \pm 1,8$	$\mu A/cm^2$

I valori di tali parametri rilevati nei nostri esperimenti rientrano nella media complessiva di quelli rilevati nei tessuti utilizzati nel corso di precedenti studi (Debellis et al. 2009).

4.2. Effetto dell'esposizione a sospensioni batteriche

L'analisi degli effetti dell'esposizione dei campioni di colon al *L. paracasei* L20 è stata effettuata mediante l'introduzione di 3 ml di sospensione batterica diluita in Krebs, nella emicamera mucosale del dispositivo di Ussing.

Per ciascun tessuto di colon prelevato erano allestite 5 camere. In quattro di esse erano poste le sospensioni batteriche a diversa concentrazione. La quinta camera serviva da controllo.

Dopo aver rilevato i parametri elettrofisiologici in ciascuna camera allestita con soluzione di Krebs in entrambi i compartimenti, fino ad ottenere una serie di

almeno quattro rilievi costanti, si procedeva all'aggiunta delle sospensioni batteriche.

Per questa operazione la misura automatica veniva interrotta, quindi, per evitare sbilanci di pressione idrostatica che avrebbero potuto danneggiare l'epitelio, si rimuoveva contemporaneamente dalle due emicamere la soluzione di Krebs mediante due siringhe. Si procedeva infine ad inserire rapidamente 3 ml di sospensione batterica nell'emicamera mucosale e 3 ml di soluzione di Krebs nell'emicamera sierosale. L'operazione avveniva sempre contemporaneamente in entrambe le emicamere.

Le misure riprendevano per una durata complessiva di due ore. Con letture alternate ogni 5 minuti in modalità "Open Circuit" e "Voltage Clamp".

Come descritto nella metodica, i dati dei parametri elettrofisiologici rilevati in ogni esperimento tramite il sistema computerizzato, venivano riportati in fogli di calcolo del programma Office Excel che permetteva di calcolare in modo automatico i valori medi e l'errore standard del potenziale e della corrente transepiteliale oltre a quello della corrente di cortocircuito, nei gruppi di esperimenti condotti con lo stesso protocollo. Questi valori permettono di rappresentare graficamente il decorso temporale delle variazioni dei parametri funzionali complessivamente osservate per un certo tipo di protocollo.

A titolo di esempio in figura 31 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi dei nove esperimenti condotti utilizzando sospensioni di *L. paracasei* L20 contenenti 10^4 UFC/ml.

Si può osservare che, nel caso specifico, il potenziale transepiteliale e la corrente di cortocircuito variano in seguito all'esposizione alla sospensione batterica, mentre la resistenza transepiteliale resta virtualmente costante.

Per facilitare l'analisi e la presentazione grafica dei risultati complessivi dei diversi protocolli sperimentali, i dati sono stati raggruppati in valori medi dei dati rilevati in intervalli di 30 minuti prima e dopo il trattamento. I valori sono stati quindi trasformati in variazioni % attribuendo il valore di 100% al valore medio rilevato prima del trattamento. I valori sono stati infine riportati sotto forma di istogrammi.

L'analisi statistica è stata condotta con il test del t in ciascun gruppo di esperimenti rispetto al suo stesso controllo, ovvero al tempo $t=0$ prima dell'esposizione alla sospensione batterica. Un'analisi tra i gruppi diversi di esperimenti è stata condotta, sempre con il t-test comparando i dati rilevati nei diversi gruppi nello stesso intervallo temporale, come illustrato nel foglio di calcolo riportato in figura 31.

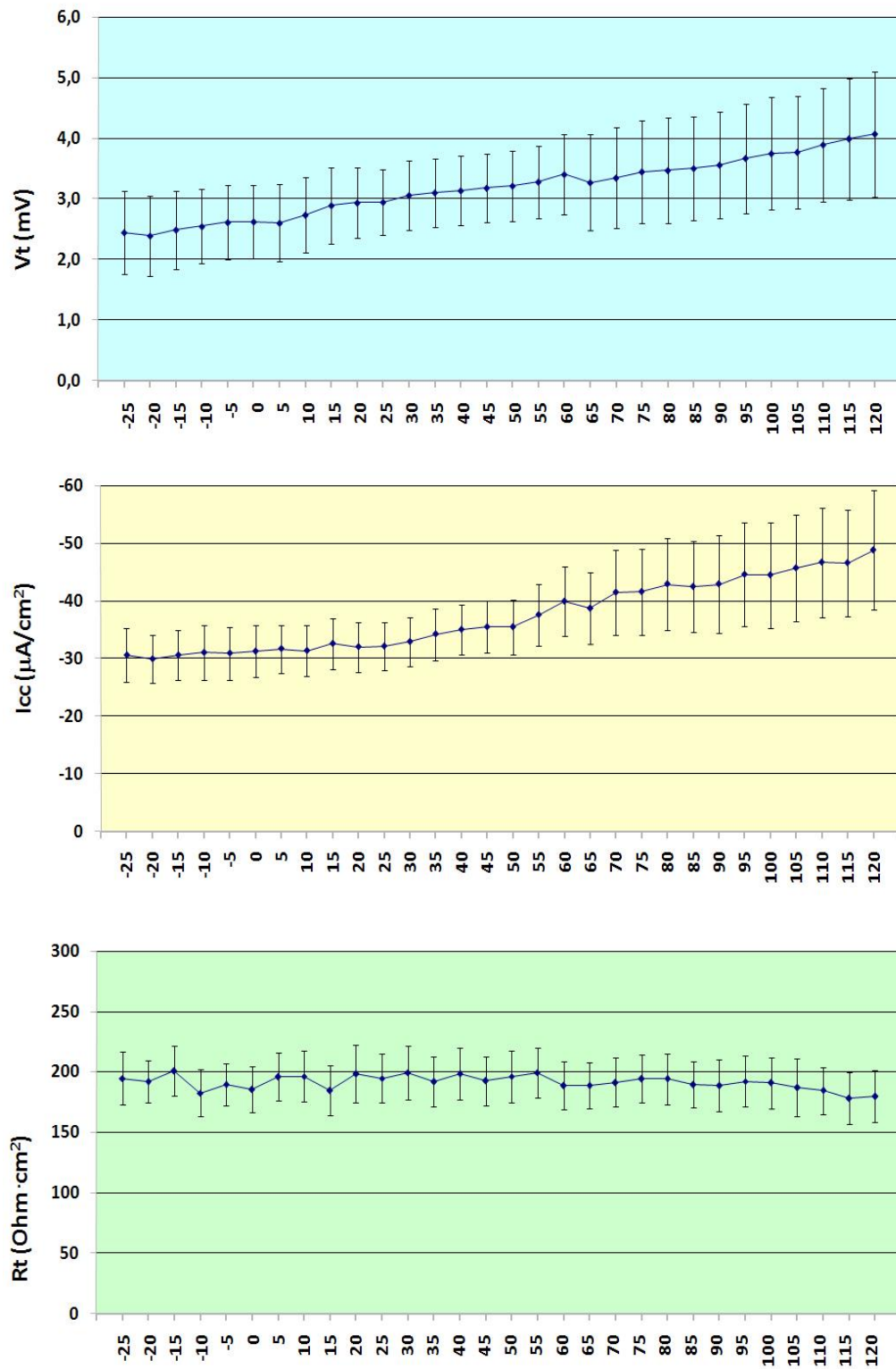


Figura 31. Effetto dell'esposizione a sospensione batterica contenente 10^4 UFC/ml di *L. paracasei* L20, aggiunta dal versante mucosale, sui parametri funzionali di colon umano.

Ciascun punto indica il valore medio \pm E.S. dei dati rilevati in nove tessuti.

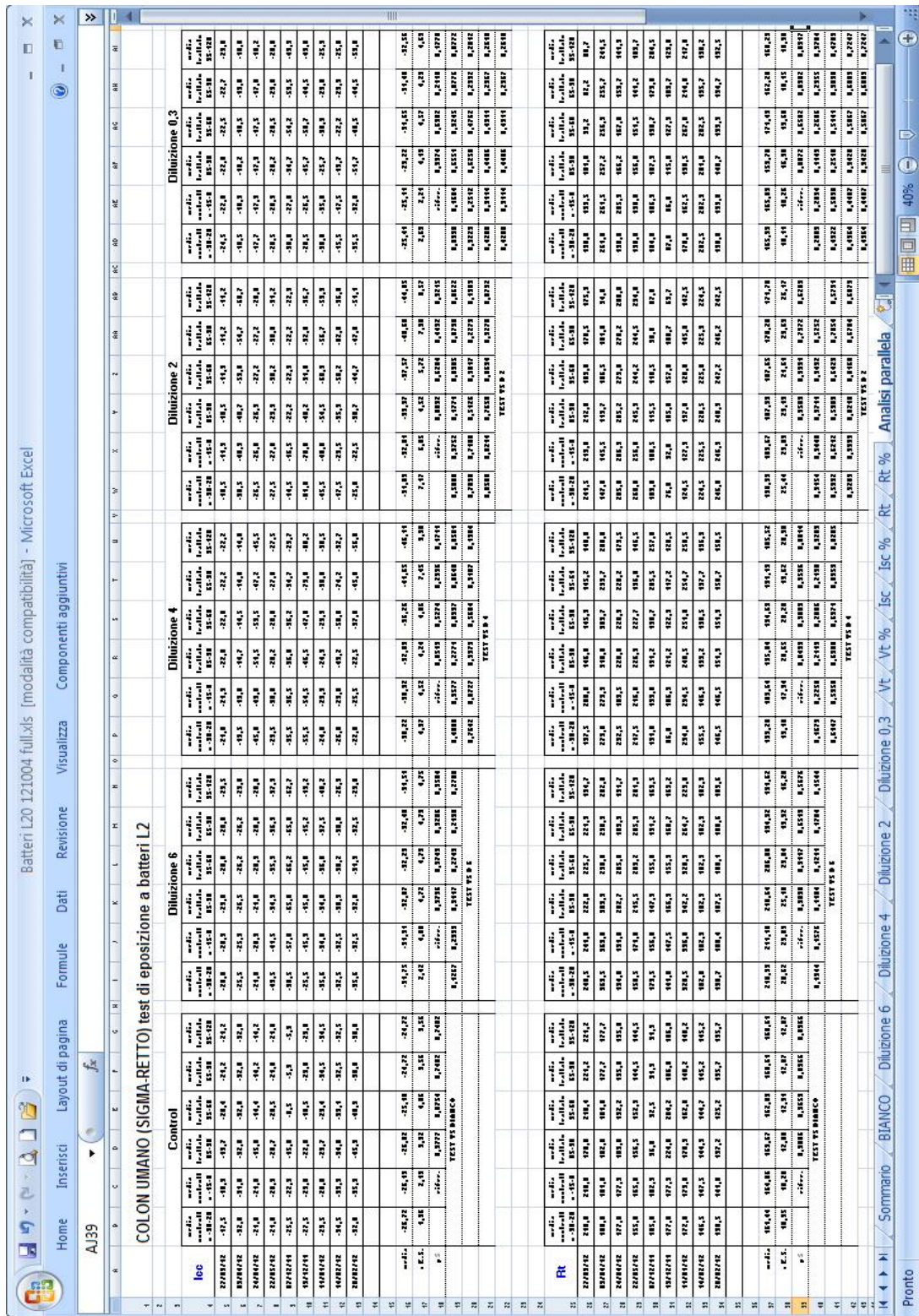


Figura 32. Foglio di calcolo per l'analisi statistica tra i gruppi diversi di esperimenti di esposizione a sospensione batteriche di *L. paracasei* L20 a concentrazioni $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^6$ e $2 \cdot 10^8$ UFC/ml, condotta con il t-test. Sono state ritenute statisticamente significative le differenze per le quali p assumeva valori inferiori a 0,05.

4.2.1. Verifica post-esperimento delle sospensioni batteriche

Dopo aver svolto i primi esperimenti preliminari ci siamo posti l'interrogativo che i batteri fossero effettivamente vitali nelle condizioni sperimentali utilizzate. Pertanto, al termine di alcuni esperimenti, le soluzioni mucosali contenenti *L. paracasei* L20 alle diverse diluizioni sono state conservate e portate nel laboratorio microbiologico per una verifica post-esperimento.

Le sospensioni sono state inoculate in piastre di Petri ed incubate con le modalità descritte in precedenza.

Dopo 48 ore di incubazione è stato eseguito il conteggio delle colonie nelle piastre che ne contenevano un numero compreso tra 30 e 300, al fine di ottenere un conteggio più accurato.

Da questo conteggio, è stato possibile risalire alla carica batterica vitale presente nelle camere di Ussing durante l'esperimento.

I valori ottenuti hanno permesso di stabilire che dopo incubazione nelle camere di Ussing la carica batterica resta immutata rispetto a quella della sospensione di partenza.

4.2.2. Effetti sui diversi segmenti di colon

4.2.2.1. EFFETTI SUL COLON DESTRO

Negli istogrammi di figura 33 sono riportati di risultati degli esperimenti condotti sui due campioni di colon destro. In questi grafici gli istogrammi riportano solo i valori medi senza l'E.S. del potenziale transepiteliale (V_t), della corrente di cortocircuito (I_{cc}) e della resistenza transepiteliale (R_t) calcolati come detto in precedenza.

Dai grafici appare evidente che i tre parametri elettrici misurati si modificano in presenza delle sospensioni di *L. paracasei* L20. Il parametro più interessante risulta essere la corrente di cortocircuito che incrementa visibilmente e progressivamente a partire dalla prima mezz'ora in poi. E' osservabile una parziale relazione dose/effetto in quanto la corrente aumenta sensibilmente in presenza delle sospensioni a densità più elevata ($2 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^6$ e $2 \cdot 10^8$ UFC/ml). Effetto analogo è osservabile anche per il potenziale transepiteliale ma in questo caso alla carica batterica più elevata corrisponde una risposta inferiore. Per quanto concerne la resistenza transepiteliale si osserva una riduzione che raggiunge il 20% circa dopo due ore di esposizione alla sospensione a carica batterica più elevata.

L'insufficienza di dati non ha permesso l'esecuzione di analisi statistica.

4.2.2.2. EFFETTI SUL COLON SIGMOIDEO

Negli istogrammi di figura 34 sono riportati i risultati degli esperimenti condotti sui tre campioni di colon sigmoideo. In questi grafici gli istogrammi riportano i valori medi \pm l'E.S. dei parametri elettrofisiologici rilevati.

Anche in questo set di esperimenti si osserva che i parametri si modificano in presenza di lactobacilli. Il parametro più indicativo risulta essere ancora la corrente di cortocircuito che raggiunge valori prossimi o superiori al 150% rispetto al controllo, tuttavia è evidente l'elevato valore di E.S. che caratterizza questi dati. Anche il potenziale transepiteliale aumenta in presenza di batteri con una variabilità notevole.

La resistenza transepiteliale si riduce lievemente ma in maniera più omogenea rispetto agli altri due parametri.

Purtroppo tutte le variazioni osservabili nel grafico non hanno significatività statistica a causa della notevole variabilità delle variazioni rilevate nei singoli esperimenti.

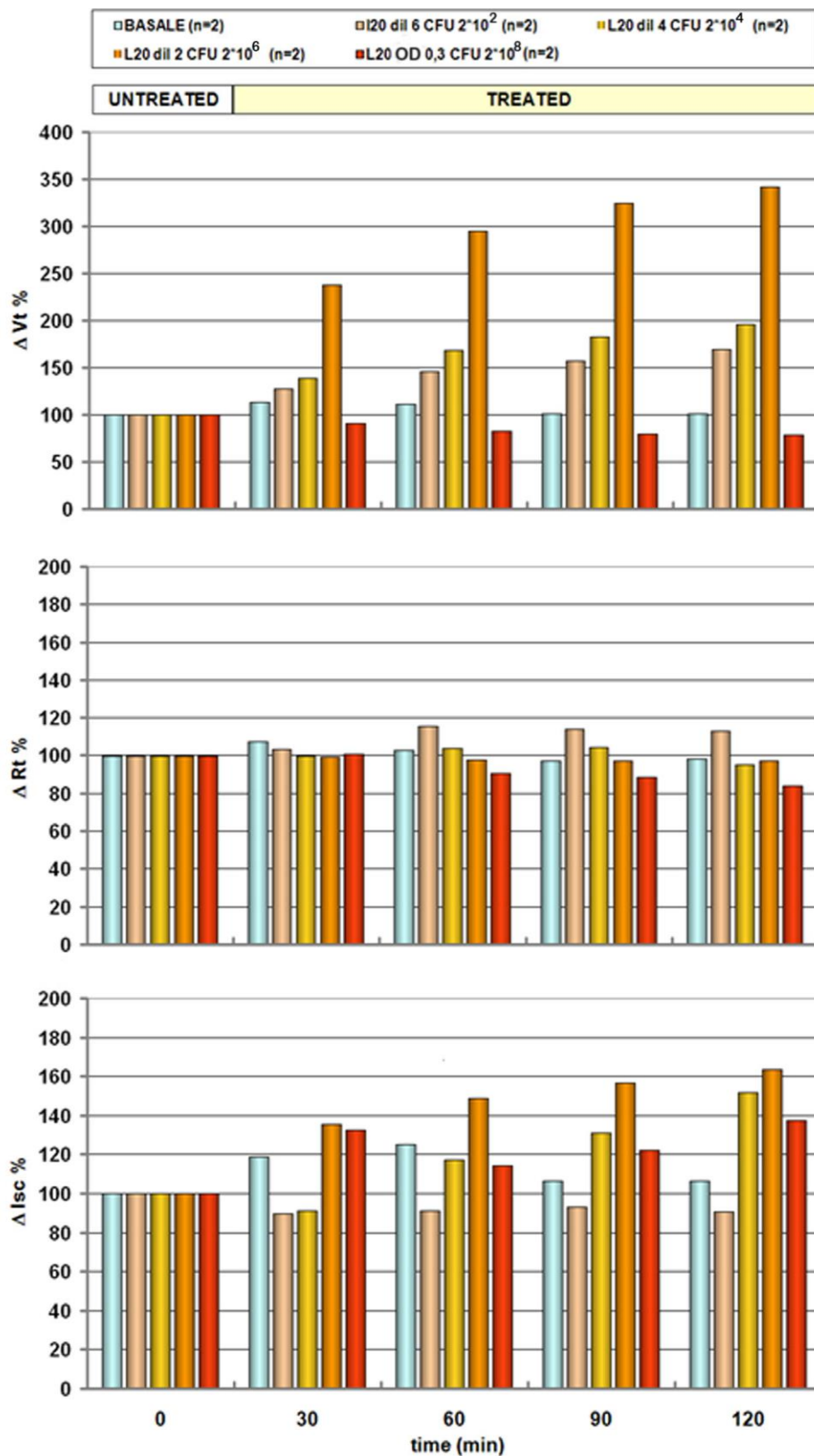


Figura 33. Effetto dell'esposizione mucosale a sospensione batterica contenente *L. paracasei* L20, come riportato in legenda, sui parametri funzionali di colon destro. Ciascun punto indica il valore medio dei dati rilevati in due tessuti.

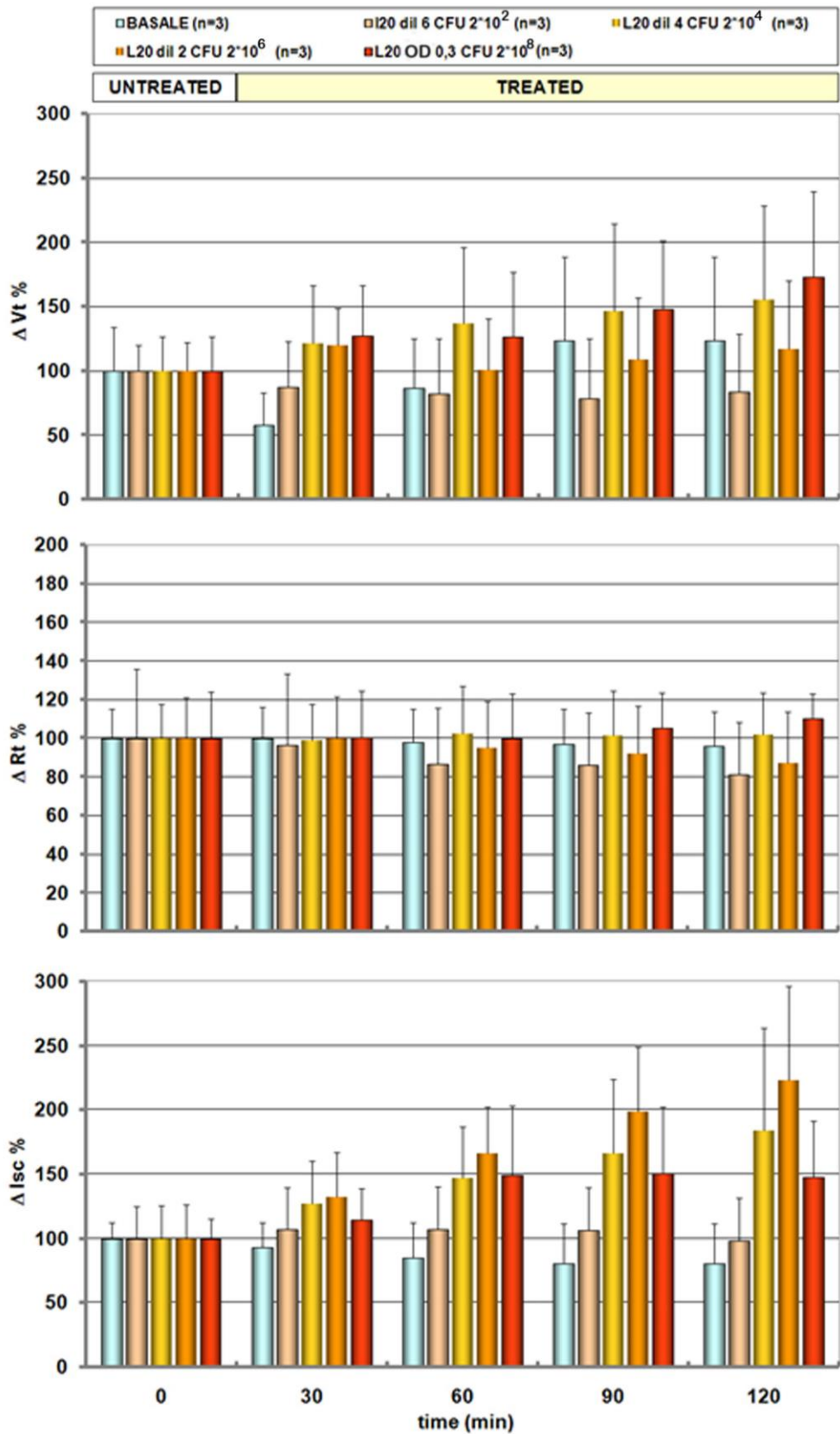


Figura 34. Effetto dell'esposizione mucosale a sospensione batterica contenente *L. paracasei* L20, come riportato in legenda, sui parametri funzionali di colon sigmoideo. Ciascun punto indica il valore medio \pm E.S. dei dati rilevati in tre tessuti.

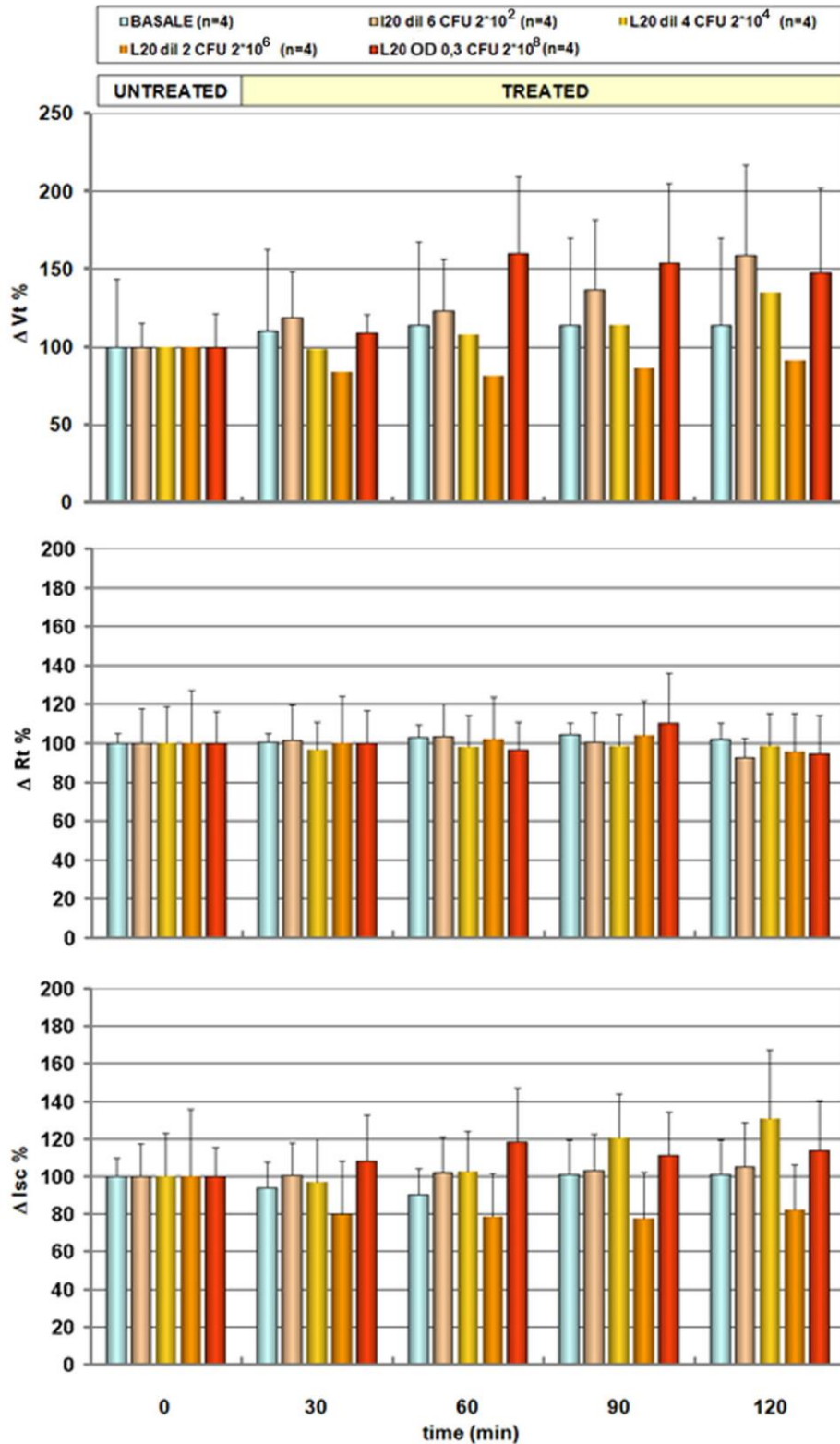


Figura 35. Effetto dell'esposizione mucosale a sospensione batterica contenente *L. paracasei* L20, come riportato in legenda, sui parametri funzionali di retto. Ciascun punto indica il valore medio \pm E.S. dei dati rilevati in tre tessuti.

4.2.2.3. EFFETTI SUL RETTO

Negli istogrammi di figura 35 sono riportati i risultati degli esperimenti condotti sui tre campioni di colon retto. In questi grafici gli istogrammi riportano i valori medi \pm l'E.S. dei parametri elettrofisiologici rilevati.

I parametri in questo tratto intestinale variano in risposta all'esposizione ai batteri probiotici in maniera molto imprevedibile senza alcuna correlazione con l'entità della carica batterica. Non è possibile definire alcun trend particolare. Anche la resistenza transepiteliale, che negli altri casi si riduceva lievemente ma in maniera abbastanza omogenea, in questo caso non varia.

Tutte le variazioni osservabili non hanno significatività statistica, come per gli esperimenti condotti sugli altri tratti.

4.2.3. Analisi complessiva

Allo scopo di verificare se una valutazione complessiva, ottenuta riunendo senza distinzione tutti i dati ottenuti per i tratti di intestino crasso utilizzati, sia in grado di dare una visione più chiara degli effetti prodotti dai batteri, sono stati realizzati i grafici riportati in figura 34. Appare evidente che i tre parametri elettrici misurati si modificano in presenza delle sospensioni di *L. paracasei* L20. Il parametro che varia in maniera più evidente è la corrente di cortocircuito che incrementa visibilmente e progressivamente a partire dalla prima mezz'ora in poi. E' osservabile una parziale relazione dose/effetto in quanto la corrente aumenta sensibilmente in presenza delle sospensioni a densità più elevata ($2 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^6$ e $2 \cdot 10^8$ UFC/ml) anche se nelle misure degli ultimi 30 min l'effetto maggiore è dato dalla sospensione a densità $2 \cdot 10^4$ UFC/ml. Effetto analogo è osservabile anche per il potenziale transepiteliale che aumenta con modalità simili ma la presenza di errori standard più ampi indica la minore valenza di queste risposte. Per quanto concerne la resistenza transepiteliale si osserva una lieve riduzione, non superiore al 10% dopo due ore di esposizione alla sospensione batterica.

Purtroppo anche mettendo insieme i dati di tutti gli esperimenti disponibili, le variazioni osservabili nel grafico non hanno significatività statistica a causa della notevole variabilità dei valori rilevati nei singoli esperimenti.

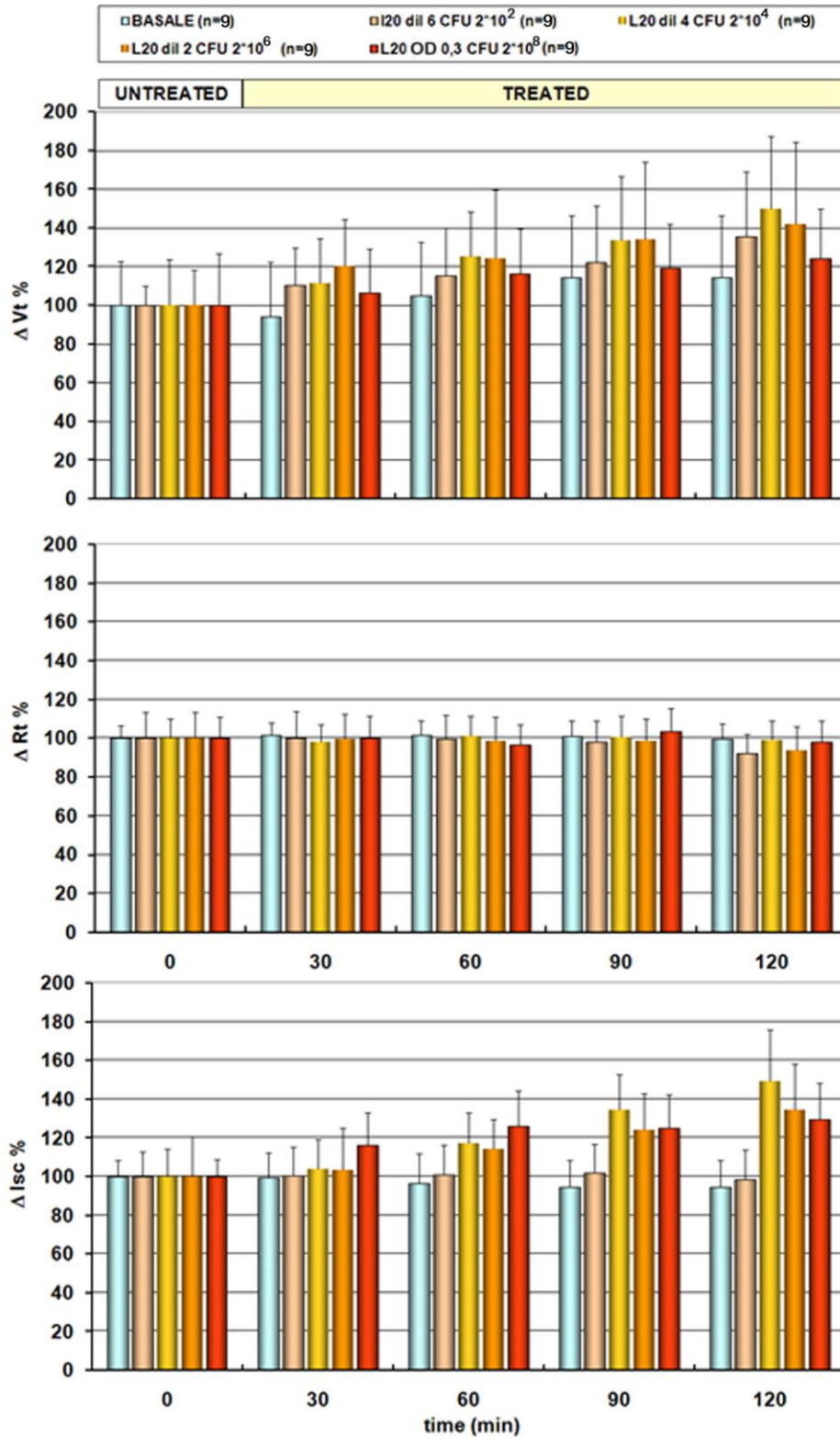


Figura 36. Effetto dell'esposizione mucosale a sospensione batterica contenente *L. paracasei* L20, come riportato in legenda, sui parametri funzionali di colon umano. Ciascun punto indica il valore medio \pm E.S. dei dati rilevati in nove tessuti.

5. CONCLUSIONI

Le sospensioni batteriche, del ceppo probiotico *Lactobacillus paracasei* L20, sono state utilizzate per la prima volta in questa occasione, quindi non abbiamo a disposizione dei dati di esperimenti condotti in precedenza.

Con il presente lavoro di tesi abbiamo voluto studiare l'effetto di diverse concentrazioni di sospensioni batteriche, del ceppo probiotico *L. paracasei* L20, sulla funzionalità della mucosa colonica umana. A tale scopo sono stati misurati il trasporto ionico e la permeabilità di membrana in campioni di mucosa di colon umano ottenuti nel corso di interventi di colectomia subtotale montata in camera di Ussing.

Il sistema della camera di Ussing permette di valutare i parametri elettrici del tessuto: la differenza di potenziale transmurale (V_t), l'intensità di cortocircuito (I_{cc}), indice di permeabilità e di trasporto ionico attivo netto transmembrana attraverso l'epitelio, e la resistenza transmurale (R_t), indice di vitalità del tessuto.

Tale sistema è stato ampiamente utilizzato in letteratura sul modello di colon di ratto (Yong et al. 1991; Feldman 1994; Fasano et al. 1994; Greenwood-Van Meerveld & Tyler 2000; Schultheiss & Diener 2000; cit.in Kumzelmann & Mall 2002) e, grazie ai nostri esperimenti, anche su colon umano (Debellis et al. 2009) oltre che di ratto (Moschetta et al. 2003).

Ad oggi, l'utilizzo di questo sistema sperimentale è stato utilizzato per testare l'effetto di numerose sostanze, sui diversi parametri funzionali del colon, riguardanti la permeabilità e il trasporto ionico, ma pare che in nessun tipo di esperimento siano state utilizzate delle sospensioni batteriche probiotiche.

I dati ottenuti, mediante gli esperimenti riportati nella seguente tesi, non sono significativi, infatti i valori riguardanti la permeabilità e il trasporto ionico, non sembrano subire delle modificazioni in seguito all'esposizione del tessuto alle diverse concentrazioni delle sospensioni batteriche. Sembra che nessuna delle concentrazioni batteriche utilizzate abbia dato esiti positivi.

Tutto ciò dimostra che le condizioni sperimentali utilizzate probabilmente non sono molto appropriate per l'utilizzo di sospensioni batteriche. I motivi che ci portano a tali conclusioni possono essere diversi: innanzitutto il sistema sperimentale prevede, per mantenere vitale il tessuto, l'utilizzo dell'ossigeno, non ben tollerato dai batteri da noi utilizzati, in quanto sono dei batteri anaerobi facoltativi. Sebbene la presenza di ossigeno non determini una riduzione della vitalità batterica, come dimostrato dai saggi sulla vitalità batterica post esperimento, questa condizione potrebbe ugualmente interferire con l'attività batterica nelle nostre condizioni sperimentali.

Un altro aspetto da mettere in evidenza è il moto turbolento dell'ossigeno all'interno della "camera di Ussing", indispensabile per permettere la solubilità

dell'ossigeno all'interno della soluzione. Laddove questa turbolenza è utilissima per assicurare la diffusione omogenea nella camera di Ussing di qualunque sostanza venga aggiunta nel corso dell'esperimento, potrebbe, nel caso delle sospensioni batteriche, impedirne l'adesione al tessuto e di conseguenza il rilascio di metaboliti o le interazioni dirette che potrebbero apportare delle modifiche ai parametri funzionali del colon umano. Naturalmente questi moti così turbolenti non sono presenti nel lume intestinale.

Questi e molti altri aspetti potrebbero essere un ostacolo per il buon funzionamento degli esperimenti; ma queste sono unicamente delle nostre supposizioni.

La presenza di risposte visibili, anche se non significative, lascia aperta la possibilità che migliorando le condizioni sperimentali, o forse utilizzando estratti batterici invece di cellule integre, si possa giungere all'osservazione di effetti più definiti.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, pur non avendoci dato nessuna risposta utile sugli effetti diretti dell'esposizione ai batteri lattici sui trasporti ionici del tessuto intestinale, rappresentano una fase esplorativa preliminare per poter continuare, in un futuro, il lavoro iniziato.

6. BIBLIOGRAFIA

6.1. Bibliografia consultata

- Cabras P, Martelli A - 2004 - Chimica degli alimenti - Casa editrice Piccin 1:1-2. 21: 517-518.
- Carbone E, Cicirata F, Aicardi G - 2009 - Apparato gastrointestinale. In: Fisiologia dalle molecole ai sistemi - EdiSES, Napoli, pp. 689-753.
- Castano P, Donato RF - 2006 - Apparato digerente. In: Anatomia dell'uomo - Edi-ermes, 2, Milano, pp. 205-238.
- Cozzani I, Dainese E - 2006 - Biochimica degli alimenti e della nutrizione - Casa Editrice Piccin-ed. 7: 134.
- Debellis L, Diana A, Arcidiacono D, Fiorotto R, Portincasa P, Altomare DF, Spirlì C, de Bernard M - 2009 - The *Vibrio cholerae* cytolysin promotes chloride secretion from intact human intestinal mucosa. - PLoS One. 4(3): e5074. Epub 2009 Mar 31.
- Kunzelmann K, Mall M - 2002 - Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanism and implications for disease - *Physiol Rev*; 82 (1): 245-289
- Lavermicocca, P, Valerio, F, Evidente, A, Lazzaroni, S, Corsetti, A, Gobbetti, M - 2000 - Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B -. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4084-4090.
- Lavermicocca, P, Valerio, F, Lonigro, SL, Di Leo, A, Visconti, A - 2008 - Antagonistic activity of potential probiotic lactobacilli against the ureolytic pathogen *Yersinia enterocolitica* - *Curr. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 728-764 Table of Contents.
- Moschetta A, Portincasa P, Debellis L, Petruzzelli M, Montelli R, Calamita G, Gustavsson P, Palasciano G - 2003 - Basolateral Ca²⁺-dependent K⁺-channels play a key role in Cl⁻ secretion induced by taurodeoxycholate from colon mucosa. - *Biol Cell.* 95(2):115-22.
- Turpin W, Humblot C, Thomas M, Guyot JP - 2010 - Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. - *Int J Food Microbiol.* 143(3):87-102. Epub 2010 Aug 7.

6.2. Bibliografia citata

- Aiba Y, Suzuki N, Kabir AM, Takagi A, Koga Y - 1998 - Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. - *Am. J. Gastroenterol.* 93: 2097-2101.
- Allen SJ, Okoko B, Martines E, Gregorio G, Dans LF - 2004 - Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD 003048.
- Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D - 2009 - Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients - *PLoS ONE* 4. E 7125.
- Axelsson LT - 2004 - Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A (ed.) - *Lactic Acid Bacteria - Microbiology and functional aspects.* 2^a edizione. Marcel Dekker Inc., New York. NY, USA. Pp. 1-66
- Berg RD - 1996 - The indigenous gastrointestinal microflora - *Trends Microbiol.* 4: 430-435.
- Bjorkroth J, Holzapfel W - 2006 - Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* - In: Dworkin M. (ed.), *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, Vol. 4. 3^a ed. Springer-Verlag, New York, NY, USA. Pp. 267-319.
- Borthakur A, Gill RK, Tyagi S, Koutsouris A, Alrefai WA, Hecht GA, Ramaswamy K, Dudeja PK - 2008 - The probiotic *Lactobacillus acidophilus* stimulates chloride/hydroxyl exchange activity in human intestinal epithelial cells. - *J. Nutr.* 138: 1355-1359.
- Buck, BL, Altermann, E, Svingerud, T, Klaenhammer, TR - 2005 - Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus NCFM*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8344-8351.
- Burgess CM, Smid EJ, van Sinderen D - 2009 - Bacterial vitamin B2, B11, and B12 overproduction: an overview - *Int. J. Food Microbiol.* 133, 1-7.
- Calder PC, Krauss-Etschmann S, de Jong EC, Dupont C, Frick JS, Frokiaer H, Heinrich J, Garn H, Koletzko S, Lack G, Mattelio G, Renz H, Sangild PT, Schrezenmeir J, S tulning TM, Thimann T, Wold AE, Koletzko B - 2006 - Early nutrition and immunity- progress and perspectives - *Br. J. Nutr.* 96:774-790.
- Caragay AB - 1992 - Cancer preventive foods and ingredients - *Food Technol.* 46: 65-8.
- Castaldo, C, Vastano, V, Siciliano, RA, Candela, M, Vici, M, Muscariello, L, Marasco, R, Sacco, M - 2009 - Surface displaced alpha-enolase of

Lactobacillus plantarum is a fibronectin binding protein. *Microb. Cell. Fact.* 8, 14.

- Cremonini F, Talley NJ - 2005 - Irritable bowel syndrome: epidemiology, natural history, health care seeking and emerging risk factors - *Gastroenterol. Clin. North Am.* 34: 189-204.
- Cristfaro EH, Mattu F, Wurhmann JJ - 1974 - Involment of the raffinose family oligosaccharides in flatulence - In: Sipple, H. L., McNatt, K. W. (Eds.), *Sugar in Nutrition*. Academic Press, New York, p. 313.
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Felselau S, Laue C, Schrezenmeir J - 2001 - Probiotics-compensation for lactase insufficiency - *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 421S-429S.
- Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid MB - 1999 Scientific concepts of functional foods in Europe Consensus document - *Br. J. Nutr.* 81 (Suppl 1): S1–S27
- Donkor ON, Shah NP - 2008 - Production of beta-glucosidase and hydrolisys of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk - *J. Food Sci.* 73, M15-M20.
- Donkor, ON, Henriksson, A, Vasiljevic, T, Shah, NP - 2007b - Alpha-galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chem.* 104, 10-20.
- Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH - 1995 - Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD) - *Clin. Exp. Immunol.* 102: 448-455
- Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI - 1998 - Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology - *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1157-1170.
- Famularo, G, Perluigi, M, Coccia, R, Mastroiacovo, P, De Simone, C - 2001 - Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy - *Med. Hypotheses* 56, 421-430.
- FAO/WHO - 2001 - Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization expert consultation report. FAO, Rome, Italy.
- FAO/WHO – 2008 - Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics. *Annu Rev Nutr.* 28: 215-31.
- Fasano A., Verga M Carmela, Raimondi F, Gualdini S - 1994 - Effects of deconjugated bile acids on electrolyte and nutrient transport in the rabbit small intestine in vitro - *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 18:327-333

- Feldman GM -1994 - HCO₃⁻ secretion by rat distal colon: effects of inhibitors and extracellular Na⁺. *Gastroenterology* 107: 329–338.
- Felis GE, Dellaglio F - 2007 - Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. - *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8, 44-61
- Frank DN, and NR Pace - 2008 - Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era - *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24:4-10
- Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cumming JH - 1995 - Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. - *Gastroenterology* 108: 975-982.
- Gilman J, Cashman KD - 2006 - the effect of probiotic bacteria on transepithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal-like Caco-2 cells - *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7: 1-5
- Goldin, BR, Gorbach, SL, Saxelin, M, Barakat, S, Gualtieri, L, Salminen, S - 1992 - Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* - 37, 121-128.
- Gordon HA, and L Pesti - 1971 - The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships *Bacteriol - Rev.* 35:390-429.
- Granato, D, Bergonzelli, GE, Pridmore, RD, Marvin, L, Rouvet, M, Cortesy-Theulaz, IE - 2004 - Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect. Immun.* 72, 2160-2169.
- Greenwood-Van Meerveld B, Tyler K, et al. – 2000 - Recombinant human interleukin-11 modulates ion transport and mucosal inflammation in the small intestine and colon. - *Laboratory Investigation.* 80:1269 :1280
- Grossman H, Duggan E, McGamman S, Welchert E, Hellerstein S - 1980 - The dietary chloride deficiency syndrome - *Peditrics* 66: 366-374.
- Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S - 2000 - Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study - *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3. 453-457.
- Hammes WP And RF Vogel - 1995 - The Genus *Lactobacillus* - p. 19-54. In BJ B - Wood and w. h. Holzapfel(ed.) - The genera of lactic acid bacteria - vol. 2 Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom.
- Hammes WP, Hertel C - 2003 - The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* -. In: Dworkin K, Folkow S, Rosenberg E, Schleifer KH. Stackebrandt E (ed.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, release 3.15, [http:// link.springer-ny.com/link/service/book/10125](http://link.springer-ny.com/link/service/book/10125). Springer-Verlag, New York, NY, USA.
- Hanauer SB - 2002 - New steroids for IBD: progress report - *Gut* 51: 182-183.

- Hu FB – 2003 - The Mediterranean diet and mortality-olive oil and beyond. *N Engl J Med.* 348(26): 2595-6.
- 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.
- Ivec M, Botic T, Koren S, Jakobsen M, Weingartl H, Cencic A - 2007 - Interactions of macrophages with probiotic bacteria lead to increased antiviral response against vesicular stomatitis virus. *Antivir - Res.* 75: 266-274
- Jeun J, Kim S, Cho SY, Jun HJ, Park HJ, Seo JG, Chung MJ - 2009 - Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice - *Nutrition* 26: 321-330
- Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E - 2001 - Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebocontrolled trial - *Lancet* 357: 1076-1079.
- Karahan, AG, Cakmakci, ML, Cicioglu-Aridogan, B, Kart-Gundogdu, A - 2005 -Nitric oxide (NO) and lactic acid bacteria-contributions to health, food quality, and safety- *Food Rev. Int.* 21, 313-329.
- Keys A, Keys M – 1975 - How to Eat Well and Stay Well, The Mediterranean Way - Doubleday, New York, NY.
- Kinoshita, H, Uchida, H, Kawai, Y, Kawasaki, T, Wakahara, N, Matsou, H, Watanabe, M, Kitazawa, H, Ohnuma, S, Miura, K, Horii, A, Saito, T - 2008 -Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin - *J. Appl. Microbiol.* 104, 1667-1674.
- Klaver FA, van der Meer R - 1993 - The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-deconjugating activity - *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1120-1124.
- Kleerebezem M, Vaughan EE - 2009 - Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity - *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 269-290.
- Kunze, WA, Mao, YK, Wang, B, Huizinga, JD, Ma, X, Forsythe, P, Bienenstock, J - 2009 - *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium dependent potassium channel opening - *J.Cell. Mol. Med.* 13, 2261-2270.
- Lee HS, Han SY, Bae EA, Huh CS, Ahn YT, Lee JH, Kim DH - 2008 - Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sodium-induced colitic mice - *Int. Immunopharmacol.* 8:574-580.
- Linsalata, M, Russo, F, Berloco, P, Caruso, ML, Matteo, GD, Cifone, MG, Simone, CD, Ierardi, E, Di Leo, A - 2004 - The influence of *Lactobacillus brevis* on ornithine decarboxylase activity and polyamine profiles in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa - *Helicobacter* 9, 165-172.

- Macdonald TT, Monteleone G - 2005 - Immunity, inflammation, and allergy in the gut. - Science 307: 1920-1925.
- Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall, L, Hollingsworth MA - 1999 - Probiotics inhibit enteropathogenic E. Coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression - Am. J. Physiol. 276: G941-G950.
- Manzoni P - 2007 - Use of Lactobacillus casei subspecies Rhamnosus GG and gastrointestinal colonization by Candida species in preterm neonates - J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 45: S190-S194.
- Mathara JM, Schillinger U, Guigas C, Franz C, Kutima PM, Mbugua SK, Shin HK, Holzapfel WH - 2008 - Functional characteristics of Lactobacillus spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya - Int. J. Food Microbiol. 126: 57-64.
- Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, Suzuki A, Sata M - 2005 - Probiotic Lactobacillus induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of proinflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells - Clin. Exp. Immunol. 140: 417-426.
- McCracken VJ, Chun T, Baldeon ME, Ahrne S, Molin G, Mackie RI, Gaskins H R - 2002 - TNF-alpha sensitized HT-29 colonic epithelial cells to intestinal lactobacilli - Exp. Biol. Med. (Maywood) 227: 665-670.
- Moody CS, Hassan HM - 1982 - Mutagenicity of oxygen free radicals - Proc. Natl Acad. Sci. USA 79: 2855-2859.
- Morita, H, Yoshikawa, H, Sakata, R, Nagata, Y, Tanaka, H - 1997 - Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by Lactobacillus fermentum - J. Bacteriol. 179, 7812-7815.
- Okkers DJ, Dicks LM, Silvester M, Joubert JJ, Odendaal HJ - 1999 - Characterization of pentocin TV 35b, a bacteriocin-like peptide isolated from Lactobacillus pentosus with a fungistatic effect on Candida albicans - J. Appl. Microbiol. 87: 726-734.
- Osawa R, Kuroiso K, Goto S, Shimizu A - 2000 - Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods - Appl. Environ. Microbiol. 66:3093-3097.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI - 2006 - Rotavirus and severe childhood diarrhea - Emerg. Infect. Dis. 12: 304-306.
- Park Y, Storkson JM, Albright KJ, Liu W, Pariza MW - 1999 - Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugate linoleic acid induces body composition changes in mice - Lipids 34, 235-241.
- Park YH, Kim JG, Shin YW, Kim SH, Whang KY - 2007 - Effect of dietary inclusion of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats - J. Microbiol. Biotechnol. 17: 655-662.

- Quigley EM, Flourie B - 2007 - Probiotics and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and an assessment of the evidence to date - *Neurogastroenterol. Motil.* 19: 166-172.
- Riserus U, Smedman A, Basu S, Vessby B - 2003 - CLA and body weight regulation in humans - *Lipids* 38, 133-137.
- Roselli M, Finamore A, Britti MS, Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Mengheri E - 2007 - The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* k88 infection and prevents membrane barrier damage - *J. Nutr.* 137: 2709-2716
- Rousseau, V, Lepargneur, JP, Roques, C, Remaud-Simeon, M, Paul, F - 2005 - Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms - *Anaerobe* 11, 145-153.
- Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM, Cui L, Yu M, Combatsiaris T, Galuska D, Bauman DE, Barbano DM, Charron MJ, Zierath JR, Houseknecht KL - 2001 - Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UPC-2 gene expression - *Diabetes* 50: 1149-1157.
- Schultheiss G, Diener M - 2000 - Adrenoceptor-mediated secretion across the rat colonic epithelium. - *Eur J Pharmacol.* Sep 8;403(3):251-8.
- Seth, A, Yan, F, Polk, DB, Rao, RK - 2008 - Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism - *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G1060-G1069.
- Songre-Ouattara LT, Mouquet-Rivier C, Icard-Verniere C, Humbrot C, Diawara B, Guyot JP - 2008 - Enzyme activities of lactic acid bacteria from pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition - *Int. J. Food Microbiol.* 128, 395-400.
- Stephen L, DeFelice MD - 1995 - The nutraceutical devolution, its impact on food industry - *Trends in Food sci. and Tech.* 6: 59-61.
- Stiles ME, Holzapfel WH - 1997 - Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy - *International Journal of Food Microbiology* - 36:1-29.
- Strom K, Sjogren J, Broberg A, Schnurer J - 2002 - *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3- phenyllactic acid - *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4322-4327.
- Tannock GW - 1995 - Normal microflora: an introduction to microbes inhabiting the human body - Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- Tannock GW - 1999 - Analysis of the intestinal microflora: a renaissance - *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 265-278.
- Thomas PR, Earl R - 1994 - Enhancing the food supply. In: *Opportunities in the nutrition and food sciences.* Washington, DC: National Academy Press. 98-142.

- Troost FJ, van Baarlen P, Lindsey P, Kodde A, de Vos WM, Kleerebezem M, Brummer RJ - 2008 - Identification of the transcriptional response of human intestinal mucosa to *Lactobacillus plantarum* WCFS in vivo - *BMC Genomics* 9: 374.
- Weisburger JH - 1985 - Definition of a carcinogen as a potential human carcinogenic risk. - *Jpn J. Cancer Res.* 76: 1244-1246.
- WHO - 1998 - Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee - *Lancet* 351: 1225-1232.
- Xu, J, Verstraete, W - 2001- Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli - *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 504-507.
- Yang F, Wang J, Li X, Ying T, Qiao S, Li D, Wu G - 2007 - 2-DE and MS analysis of interaction between *Lactobacillus fermentum* 15007 and intestinal cells - *Electrophoresis* 28, 4330-4339.
- Yong F Li - 1991 - Norman W Weisbrodt, Yael Harari, Frank G Moody. - Use of a modified Ussing chamber to monitor intestinal epithelial and smooth muscle functions. - *Gastrointestinal Liver Physiological.* 24:166-1