

Valutazione *in vitro* dell'attività immunomodulante di un integratore alimentare costituito da una miscela di tre specifici ceppi probiotici: *L. plantarum* P17630, *L. paracasei* I1688 e *L. salivarius* I1794

In vitro evaluation of immunomodulating activity of a food supplement containing three probiotics: *L. plantarum* P17630, *L. paracasei* I1688, *L. salivarius* I1794

Summary

Background: Probiotics have been proposed as a treatment for a lot of discomforts, both in children and adult patients. **Objective:** To evaluate the *in vitro* activity of a food supplement containing three probiotics on the release of cytokines from immune cells of healthy individuals. **Materials:** The ability of three different probiotic strains (*L. plantarum* P17630, *L. paracasei* I1688 and *L. salivarius* I1794) in a ratio of 200:4.9:0.1 to stimulate the release of five cytokines (IL-6, IL-10, IL-12, TNF-alpha and IFN-gamma) from peripheral blood mononuclear cells was evaluated at 24 h and 6 days. **Results:** An increase in expression compared to basal level was observed for IL-10, IL-12 and IFN-gamma at 24 h and 6 days after exposure to probiotics with a different time pattern. No significant increase was observed for TNF-alpha and IL-6. **Conclusion:** The probiotics used in this study are able to evoke a specific immune response in human lymphocytes with prevalence of anti-inflammatory cytokines and IFN-gamma.

Malfa P, Valsecchi C, Montagna L, et al. *In vitro* evaluation of immunomodulating activity of a food supplement containing three probiotics: *L. plantarum* P17630, *L. paracasei* I1688, *L. salivarius* I1794. *Trends Med* 2010; 10(1):65-71.

©2010 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

Patrizia Malfa*, **Chiara Valsecchi**^o, **Lorenza Montagna**^o, **Melissa Mantelli**^o, **Annamaria Castellazzi**^o

* Responsabile Ricerca & Sviluppo, Proge Farm s.r.l., Novara

^o Laboratorio di Immunologia e Nutrizione, Dipartimento di Scienze Pediatriche, Università degli studi di Pavia

Key words:

probiotic*
gut
immunomodulation
flu virus*

✉ **Annamaria Castellazzi**

Laboratorio di Immunità e Nutrizione

Dipartimento di Scienze Pediatriche

Università degli Studi di Pavia

tel +39.0382.502715

fax +39.0382.527976

e-mail: am.castellazzi@smatteo.pv.it

La superficie intestinale umana è caratterizzata dalla presenza di una complessa e abbondante flora batterica, che svolge un ruolo importante nel mantenimento della salute e del benessere dell'ospite. La flora batterica del lume intestinale, oltre a promuovere le normali funzioni gastrointestinali, favorisce la protezione contro agenti patogeni esterni e ha effetti benefici sul metabolismo sistemico¹. I batteri commensali endogeni svolgono, inoltre, un ruolo decisivo nel formare e mantenere l'omeostasi gastrointestinale². Questa caratteristica si osserva sia nell'individuo adulto che nel bambino durante tutto il periodo dello sviluppo. Molti studi hanno valutato le interazioni tra batteri ed epitelio intestinale non riuscendo però a chiarirle del tutto³. Tra i costituenti dell'epitelio intestinale i lattobacilli vengono spesso utilizzati come probiotici, cioè come microrganismi che, se ingeriti, possono avere effetti benefici sulla salute umana. Le funzioni svolte dai probiotici sono molteplici:

- 1) azione di barriera che impedisce l'attacco ed il passaggio transmucosale dei batteri patogeni;
- 2) azione metabolica con la produzione di metaboliti (enzimi, vitamine, acidi, etc) utili all'ospite;
- 3) azione immunomodulante con induzione di cellule immunocompetenti da parte dell'ospite.

La comprensione dei meccanismi, con cui la flora intestinale ed in particolare i microrganismi probiotici della flora stessa sono in grado di modulare le risposte immunitarie, può risultare di notevole rilevanza terapeutica per esempio per la produzione di supplementi probiotici con effetto immunomodulante specifico. Poiché i processi che intervengono nella stimolazione del sistema immunitario sono molteplici e tutti correlati tra di loro, diventa di fondamentale importanza comprendere quali cellule del sistema immunitario sono attivate dalla presenza di particolari ceppi probiotici. Infatti, grazie anche al legame tra le loro proteine di superficie (SLPs) e i recettori glicoproteici o glicolipidici presenti sulla superficie degli enterociti, i lattobacilli possono promuovere la sintesi di diverse citochine e modulare la risposta immunitaria^{4,5}. Diversi studi hanno mostrato che i microrganismi probiotici, che includono ceppi batterici appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ed *Enterococcus*, hanno diverse proprietà e funzioni, tra cui quelle di aderire al tessuto epiteliale dell'ospite, di eliminare i patogeni e di ridurre la capacità di adesione, di produrre acidi, perossido d'idrogeno e batteriocine che impediscono la riproduzione dei patogeni stessi. I probiotici sono inoltre in grado di stabilizzare la microflora intestinale dopo episodi infettivi e/o antibioticoterapia nel bambino⁶.

Lactobacillus salivarius I1794 (Proge Farm, Italia) e *Lactobacillus paracasei* I1688 (Proge Farm, Italia) sono due ceppi di batteri probiotici le cui proprietà immunomodulanti sono già state valutate su cellule mononucleate di sangue periferico⁷. Questo studio ha dimostrato che questi *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus salivarius* sono in grado di indurre una specifica risposta da parte del sistema immune, caratteristica di fondamentale importanza al fine di migliorare la risposta immune, sia innata che acquisita. Nel-

l'ambito dei ceppi batterici appartenenti al genere *Lactobacillus*, si annovera la specie *plantarum* che, in diversi studi, ha mostrato la capacità di indurre il rilascio di citochine da parte di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC)⁸. In virtù della sua capacità di favorire la produzione di IL-10 da parte di macrofagi e linfociti T della mucosa intestinale, è stato anche proposto l'utilizzo di *L. plantarum* nel trattamento della IBD (Inflammatory Bowel Disease)⁹. Questa attività si estende anche ad altri lattobacilli; per esempio studi recenti hanno dimostrato che *Lactobacillus crispatus* è in grado di inibire l'adesione di patogeni ad enterociti umani tramite il processo di aggregazione cellulare¹⁰⁻¹².

L'adesione dei batteri alla mucosa intestinale è attualmente considerata una caratteristica essenziale dei batteri probiotici. Altri importanti criteri per la selezione di ceppi probiotici sono la loro capacità di superare la barriera gastrica, di resistere agli acidi gastrici ed ai sali biliari, di interagire con le cellule epiteliali, e di contrastare la colonizzazione intestinale da parte di specie patogene^{6,13}. Negli ultimi anni diversi studi si sono concentrati sulla comprensione dei meccanismi di colonizzazione dell'epitelio intestinale da parte dei probiotici. In particolare, cellule presentanti l'antigene (APCs) come monociti, macrofagi e cellule dendritiche (DCs), sono deputate al processing di patogeni e alla presentazione della loro struttura antigenica alle cellule T, stimolando così la risposta immune acquisita. Inoltre, monociti e macrofagi eliminano i microrganismi patogeni sia direttamente attraverso la fagocitosi, sia indirettamente attraverso la produzione di citochine pro-infiammatorie¹⁴. In quest'ottica, le citochine più importanti sono rappresentate da alcune interleuchine (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12), Interferone- γ (IFN- γ) e Fattore di Necrosi Tumorale- α (TNF- α). L'induzione di alcune citochine, e la loro prevalenza rispetto ad altre, assume notevole importanza per il mantenimento dell'omeostasi immunitaria: un aumento di IL-4 ed una diminuzione di IL-12 e di TNF- α induce, per esempio, la riduzione dei cloni linfocitari con fenotipo Th1 ed un aumento dei linfociti Th2, una condizione fondamentale per ridurre il processo infiammatorio.

Infine, studi più recenti hanno dimostrato che l'impiego di probiotici può aumentare la ri-

sposta anticorpale alla vaccinazione influenzale o ridurre la durata e la sintomatologia degli episodi influenzali, sia nell'adulto che nel bambino, e che queste attività sono correlate direttamente o indirettamente all'azione immunostimolante dei probiotici utilizzati, soprattutto grazie all'azione sull'attività Natural Killer (NK)¹⁵⁻¹⁷.

Scopo

Scopo del presente lavoro era valutare le proprietà immunomodulanti di una miscela contenuta nell'integratore alimentare FLOREtrix® (Sigma-Tau SpA, Pomezia, Italia), di tre specifici ceppi probiotici: *L. plantarum* P17630, *L. paracasei* I1688 e *L. salivarius* I1794. Gli eventuali effetti immunomodulanti sono stati testati attraverso una sperimentazione "in vitro" che prevedeva l'allestimento di colture cellulari di linfociti umani in presenza dello stimolo antigenico, rappresentato dalla miscela stessa. In particolare, è stato valutato in che misura questa preparazione batterica potesse stimolare "in vitro" la produzione di citochine da parte di linfociti di soggetti adulti sani. Le citochine oggetto di valutazione dopo *challenging antigenico* erano: IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α . Queste citochine sono state scelte perchè maggiormente coinvolte nei principali processi infiammatori/antinfiammatori e nell'attivazione del sistema immunitario.

Materiali e Metodi

Preparazione dei batteri probiotici

I ceppi batterici sono stati forniti sotto forma di sospensione cellulare in terreno MRS brodo. Sono stati quindi sottoposti a radiazione γ emessa da una fonte di Cesio per 24 ore ad un'intensità di 33 Gy. Dopo aver verificato l'assenza di cellule vitali, i batteri sono stati risospesi in terreno RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Scotland) per la preparazione di aliquote conservate a -20°C.

Soggetti inclusi

Per lo studio sono stati arruolati 10 volontari adulti sani, tutte donne di età compresa tra 25 e 40 anni. Le volontarie, informate sugli obiettivi dello studio, hanno dato il loro consenso a donare 10 ml di sangue periferico che è stato raccolto in provette eparinate.

Separazione dei linfociti da sangue periferico

Il sangue periferico è stato separato su Fycoll Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, Oslo, Norvegia) e le cellule mononucleate recuperate sono state congelate in FCS al 10% di DMSO e crioconservate in azoto liquido a -180°C.

Preparazione da testare

La preparazione batterica da testare era la miscela contenuta nel prodotto FLOREtrix® (Sigma Tau SpA, Pomezia, Italia) costituita da un mix di tre specifici ceppi: *L. plantarum* P17630 + *L. paracasei* I1688 + *L. salivarius* I1794 in rapporto 200:4,9:0,1. I ceppi, depositati presso Enti di Collezione quali la BCCM/LMG di Gent (Belgio) e l'Istituto Pasteur di Parigi (Francia) sono coperti da brevetto (Proge Farm Srl, Novara, Italia).

Colture cellulari

I linfociti sono stati messi in coltura in terreno RPMI 1640+10%FCS (Euroclone) in piastre da 96 pozzetti in presenza delle preparazioni batteriche da testare in rapporto di concentrazione 1:1. I linfociti sono stati messi in coltura per 24 ore o per 6 giorni in incubatore a 37°C, 5% CO₂.

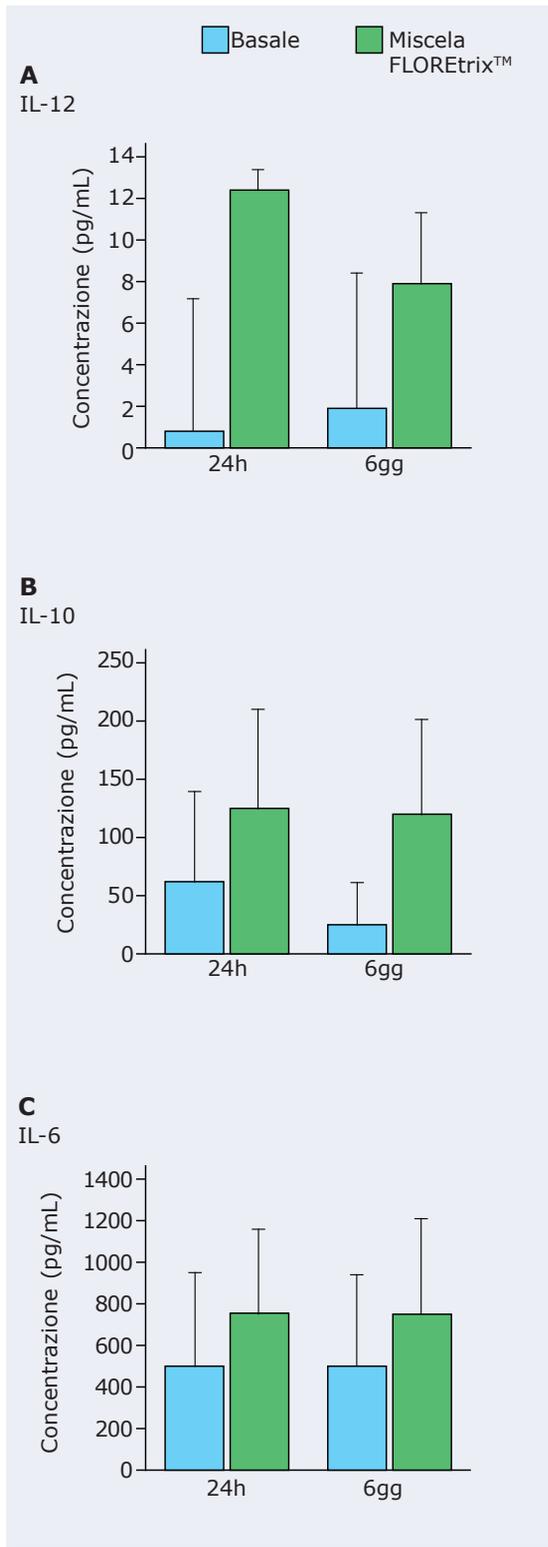
Produzione "in vitro" delle citochine

Il dosaggio delle citochine prodotte dai leucociti e rilasciate nei surnatanti di coltura dopo stimolazione con le preparazioni batteriche è stato effettuato mediante metodica ELISA messa a punto nel nostro laboratorio e descritta da Castellazzi e collaboratori⁷. La produzione delle citochine (IL-10, IL-12, IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-4) è stata valutata dopo 24 ore o dopo 6 giorni di coltura con le preparazioni batteriche in esame. Gli anticorpi e i tamponi per il dosaggio ELISA di IL-10, IL-6 e TNF- α sono Endogen, Tema (Italia), mentre per il dosaggio dell'IFN- γ ci siamo avvalsi di anticorpi e tamponi della Mabtech (Svezia).

Risultati

La miscela dei tre ceppi probiotici ha stimolato il rilascio delle citochine, oggetto di valutazione, in misura ampia e significativa ad eccezione di IL-4 (non dosata) e parzialmente di IL-6 le cui variazioni sono state più modeste e statisticamente non significative. Tali variazioni sono state osservate sia dopo 24 ore che dopo 6 giorni di incubazione.

Figura 1. Effetti della miscela di *L. plantarum* P17630, *L. paracasei* I1688 e *L. salivarius* I1794 sulla induzione delle tre interleuchine oggetto di valutazione. I dati, comparati al basale, sono stati registrati sia dopo 24 ore che dopo 6 giorni di incubazione.



Induzione di interleuchine

Le variazioni maggiori sono state osservate a carico della IL-12, le cui concentrazioni sono aumentate di oltre 10 volte rispetto al basale (figura 1A). Tale effetto si è mantenuto a distanza di 6 giorni anche se l'incremento è stato di dimensioni minori rispetto alla stimolazione a 24 h ($p < 0,013$), implicando un maggior coinvolgimento dell'immunità innata (24h), rispetto a quella acquisita (6gg).

Diverso è stato l'effetto del preparato sul rilascio di IL-10: la produzione di questa citochina nei surnatanti di coltura non è infatti aumentata con la stessa rapidità osservata per la IL-12 e dopo 24 ore di stimolazione l'incremento non è risultato statisticamente significativo (figura 1B). Al contrario, dopo 6 giorni, si è registrato un aumento di circa tre volte delle concentrazioni basali, un risultato statisticamente significativo ($p = 0,03$). In questo caso la produzione di IL-10 è da ascrivere principalmente alle cellule dell'immunità acquisita.

La quantità di IL-6 rilasciata dopo 24 ore nei surnatanti di coltura da parte delle cellule della immunità innata (cellule dendritiche, monociti, cellule presentanti l'antigene), ha mostrato uno scarso incremento, privo di significato statistico. Anche dopo 6 giorni di coltura la produzione di IL-6, dovuta principalmente alle cellule dell'immunità acquisita, non ha mostrato un incremento significativo (figura 1C).

Induzione di *INF-γ* e *TNF-α*

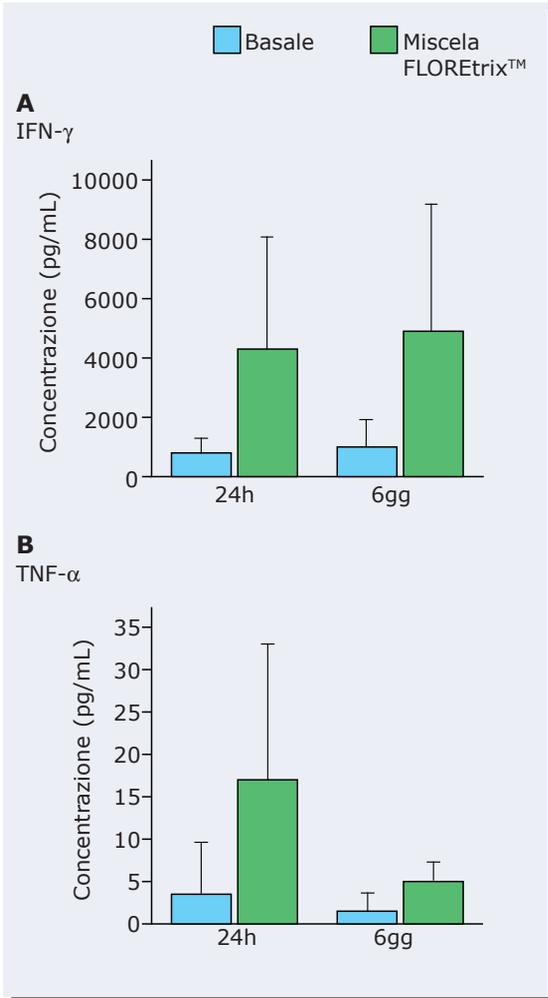
La produzione di Interferone γ è risultata aumentata in misura apprezzabile già dopo 24 ore di incubazione, anche se l'alta variabilità fra la risposta dei diversi soggetti non ha consentito di raggiungere la significatività statistica; tale differenza è diventata invece statisticamente significativa dopo 6 giorni di stimolazione (figura 2A).

Andamento inverso nel tempo è stato osservato per la produzione di *TNF-α*, aumentato in maniera statisticamente significativa nei surnatanti di coltura dopo 24 ore ($p < 0,05$), mentre dopo 6 giorni l'incremento rispetto al basale è risultato modesto e sensibilmente minore rispetto alla variazione registrata nelle prime 24 ore (figura 2B).

Discussione

La possibilità di modulare il sistema immunitario con miscele di ceppi probiotici, sia nel

Figura 2. Rilascio di Interferone- γ e Fattore di Necrosi Tumorale- α dopo stimolazione antigenica con il preparato in esame: la variazione di IFN- γ è risultata ampia e rapida a partire dalle prime 24 ore e tale effetto si è mantenuto nei successivi 6 giorni; l'effetto sul TNF- α è stato altrettanto ampio ma di più breve durata.



senso di ridurre la risposta infiammatoria che di allertare la vigilanza immunitaria, è una opportunità molto allettante sotto il profilo clinico. Gli effetti di tali preparazioni sono stati provati in numerose condizioni cliniche caratterizzate da disregolazione della risposta immune con esaltazione della componente infiammatoria e/o allergica, dalle malattie infiammatorie croniche dell'intestino alle intolleranze alimentari¹⁸⁻²⁰. Come interpretare i risultati da noi ottenuti? Il preparato testato in questo studio, composto da un mix di tre batteri (*L. plantarum* P17630, *L. paracasei* I1688, *L. salivarius* I1794) in rapporto 200:4,9:0,1, si

è dimostrato in grado di stimolare la produzione di varie citochine con diverso andamento temporale.

L'interleuchina-6 è una proteina multifunzionale che riveste un ruolo importante nella risposta infiammatoria acuta, nell'emopoiesi e nella risposta immunitaria, in particolare la IL-6 stimola la proliferazione dei linfociti B e, quindi, la secrezione di immunoglobuline. Il suo ruolo nell'infiammazione, che si esprime attraverso l'effetto inibitorio esercitato su TNF- α , IL-1 e sull'attivazione di IL-10, è importante soprattutto nella cronicizzazione dell'infiammazione, in quanto media il passaggio dallo stadio acuto a quello cronico^{21,22}. Insieme al TNF- α e alla IL-1 la IL-6 forma la triade infiammatoria. Negli esperimenti effettuati si evidenzia un suo incremento sia dopo 24 ore che dopo 6 giorni di stimolazione.

La IL-10 è nota anche come Fattore Inibitorio della Sintesi di Citochine (CSIF) ed è prodotta prevalentemente dai monociti. Esprime effetti pleotropici sull'immunoregolazione: inibisce l'espressione di citochine Th1, antigeni MHC di classe II e di molecole costimolatorie sui macrofagi, aumenta la sopravvivenza e la proliferazione dei linfociti B e, di conseguenza, la produzione di anticorpi. Ha un effetto inibitorio sulla sintesi di citochine pro-infiammatorie quali IL-1, IL-3, IL-6, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF e sulla capacità delle APC di presentare l'antigene²³. Ciò spiega perché nei monociti dei pazienti con asma grave si riscontra una bassa secrezione di IL-10 e IL-12²⁴. L'incremento di IL-10 da noi registrato sia a breve termine (24 ore) sia soprattutto dopo 6 giorni di stimolazione, potrebbe quindi spiegare da una parte gli effetti positivi sulla flogosi intestinale (IBD), effetto ben noto al clinico, e dall'altra la migliore risposta anticorpale osservata *in vitro* dopo attivazione linfocitaria²⁵.

La IL-12 è una citochina che, come l'IL-10, ha un'azione sia immunosoppressiva che immunostimolante. La sua azione biologica principale consiste nell'incrementare la risposta immunitaria cellulo-mediata, stimolando la produzione di IFN- γ e TNF- α da parte di linfociti T-citotossici e cellule NK. Induce inoltre la differenziazione dei linfociti T *naive* in Th1, evento chiave per i processi di adesione dei patogeni alle mucose intestinali, come dimostrato dalla maggiore propensione all'infezione intestinale da *Citrobacter rodentium* in topi con delezione del gene per la sintesi di IL-12²⁶.

L'IFN- γ è un potente immunoregolatore della risposta cellulo-mediata. La sua azione si esplica nell'attivazione della presentazione dell'antigene da parte dei macrofagi, nell'aumento dell'attività lisosomiale dei macrofagi stessi, nell'incremento dell'attività delle cellule NK, nell'attivazione delle APC e nel promuovere la differenziazione dei linfociti T *naive* verso la sottopopolazione Th1. Oltre ad avere una spiccata azione immunoregolatoria, l'IFN- γ possiede attività anti-virale aspecifica, inclusa quella verso i virus respiratori e contro vari patogeni intracellulari^{27,28}. *I benefici osservati in studi clinici nei quali la somministrazione long-term di probiotici ha ridotto l'impatto della malattia influenzale, in termini di contagio e durata, sono probabilmente da attribuire per la maggior parte all'induzione di questa citochina, le cui concentrazioni erano in questo studio più che triplicate rispetto al basale dopo stimolazione con il preparato in esame.*

Il TNF- α è la prima citochina ad essere rilasciata in seguito ad infezioni virali e batteriche, soprattutto da Gram⁻, ed è coinvolta nei processi di infiammazione locale, nell'attivazione di cellule endoteliali, nel meccanismo di insorgenza della febbre e nell'induzione di proteine della fase acuta (APP)²⁹. Dagli esperimenti effettuati si osserva un incremento statisticamente significativo nella produzione di TNF- α dopo 24 ore, con una riduzione sensibile dopo 6 giorni di coltura.

Conclusioni

Dai risultati "in vitro" della stimolazione con la miscela batterica testata e dalle considerazioni sulle proprietà delle diverse citochine analizzate nel presente lavoro, si può concludere che la miscela di batteri probiotici contenuta in FLOREtrixTM presenta, insieme ad una buona attività anti-infiammatoria, la capacità di stimolare una potente risposta linfocitaria.

Bibliografia

1. Pickard KM, Bremner AR, Gordon JN, et al. Microbial-gut interactions in health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18:271-285.
2. Gill H, Prasad J. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. *Adv Exp Med Biol* 2008; 606:423-454.
3. Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol* 2006; 17:204-210.

In particolare preme evidenziare una bassa induzione di TNF- α , citochina strettamente legata alla risposta infiammatoria. Presi complessivamente, i risultati da noi ottenuti sono caratterizzati da un notevole incremento di IL-10, IL-12, IFN- γ : questo particolare profilo sembrerebbe suggerire che la miscela batterica contenuta in FLOREtrixTM abbia buone proprietà anti-infiammatorie (IL-10 e IL-12), anti-virali (IFN- γ), e che tale miscela sia quindi capace di attivare i meccanismi umorali e cellulari (NK) che giocano un ruolo fondamentale nelle infezioni.

La polarizzazione Th1/Th2 è controllata da un network di segnali extracellulari che coinvolge sia cellule dell'immunità innata che acquisita. Infatti, quando i T-helper *naive* CD4⁺ vengono attivati dalle APC che forniscono adeguati segnali co-stimolatori, si differenziano in Th1 o Th2. Imboccare una o l'altra di queste direzioni dipende dalla presenza di fattori microambientali e/o dai segnali, presenti sulla superficie batterica, che interagiscono con i recettori delle APC. In questa operazione entrano in gioco anche le citochine prodotte dai due tipi cellulari: IFN- γ , IL-12 e TNF- α per i Th1, e IL-4, IL-5, IL-10 ed IL-13 per i Th2.

Recentemente è stato ipotizzato che i linfociti Th1 siano il risultato di un processo maturativo dei Th2. Questa ipotesi, se confermata, avallerebbe sperimentalmente l'importanza dei probiotici sulla modulazione del sistema immune, essendo tale differenziazione guidata dallo stimolo maturativo prevalentemente fornito da IL-12 e IFN- γ . In conclusione, oltre ai già provati effetti benefici dei probiotici sulla flora intestinale, in senso maturativo ed anti-infiammatorio, sarebbero auspicabili studi ulteriori per valutare se gli effetti immunostimolanti summenzionati abbiano rilevanza clinica nella profilassi di alcune infezioni virali, in particolare quelle da virus influenzali. **TiM**

4. Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potenziale pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002; 15:1-9.
5. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, et al. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 2009; 44:26-46.
6. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy—a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2009; 101:1722-1726.

7. **Castellazzi AM, Valsecchi C, Montagna L, et al.** In vitro activation of mononuclear cells by two probiotics: *Lactobacillus paracasei* I 1688, *Lactobacillus salivarius* I 1794, and their mixture (PSMIX). *Immunol Invest* 2007; 36:413-421.
8. **Miettinen M, Vuopio-Varkila J, Varkila K.** Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* 1996; 64:5403-5435.
9. **Pathmakanthan S, Li CK, Cowie J, et al.** *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19:166-173.
10. **Todoriki K, Mukai T, Sato S, et al.** Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *J Appl Microbiol* 2001; 91:154-159.
11. **Horie M, Ishiyama A, Fujihira-Ueki Y, et al.** Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer. *J Appl Microbiol* 2002; 92:396-403.
12. **Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, et al.** Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43:197-204.
13. **Alander M, Korpela R, Saxelin M, et al.** Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24:361-364.
14. **Karlsson H, Larsson P, Wold AE, et al.** Pattern of cytokine responses to gram-positive and gram-negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells. *Infect Immun* 2004; 72:2671-2678.
15. **Leyer GJ, Li S, Mubasher ME, et al.** Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. *Pediatrics* 2009; 124:e172-e179.
16. **Winkler P, de Vrese M, Laue Ch, et al.** Effect of a dietary supplement containing probiotic bacteria plus vitamins and minerals on common cold infections and cellular immune parameters. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2005; 43:318-326.
17. **Pregliasco F, Anselmi G, Fonte L, et al.** A new chance of preventing winter diseases by the administration of symbiotic formulations. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42 (Suppl 3 Pt 2):S224-S233.
18. **Brenner DM, Moeller MJ, Chey WD, et al.** The utility of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2009; 104:1033-1049.
19. **Björkstén B.** Evidence of probiotics in prevention of allergy and asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4:599-604.
20. **Miraglia del Giudice M, De Luca MG.** The role of probiotics in the clinical management of food allergy and atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38 (6 Suppl):S84-S85.
21. **Lapensee CR, Hugo ER, Ben-Jonathan N.** Insulin Stimulates Interleukin-6 Expression and Release in LS14 Human Adipocytes through Multiple Signaling Pathways. *Endocrinology* 2008; 149:5415-5422.
22. **Jones SA.** Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005; 175:3463-3468.
23. **O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, et al.** Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223:114-131.
24. **Tomita K, Lim S, Hanazawa T, et al.** Attenuated production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severe asthma. *Clin Immunol* 2002; 102:258-266.
25. **Xu Q, Katakura Y, Yamashita M, et al.** IL-10 augments antibody production in in vitro immunized lymphocytes by inducing a Th2-type response and B cell maturation. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68:2279-2284.
26. **Simmons CP, Goncalves NS, Ghaem-Maghami M, et al.** Impaired resistance and enhanced pathology during infection with a noninvasive, attaching-effacing enteric bacterial pathogen, *Citrobacter rodentium*, in mice lacking IL-12 or IFN-gamma. *J Immunol* 2002; 168:1804-1812.
27. **He XS, Draghi M, Mahmood K, et al.** T cell-dependent production of IFN-gamma by NK cells in response to influenza A virus. *J Clin Invest* 2004; 114:1812-1819.
28. **Ouyang Q, Wagner WM, Wikby A, et al.** Compromised interferon gamma (IFN-gamma) production in the elderly to both acute and latent viral antigen stimulation: contribution to the immune risk phenotype? *Eur Cytokine Netw* 2002; 13:392-394.
29. **Taylor PC, Williams RO, Feldmann M.** Tumor necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15:557-563.

Ricomponi l'equilibrio intestinale



INTEGRATORE ALIMENTARE PROBIOTICO
con **50 miliardi di lattobacilli vivi**
e vitamine

sapore
vaniglia

 **sigma-tau** s.p.a.
industrie farmaceutiche riunite