



Principio attivo derivato da siero di Fontina DOP

Stato dell'arte

La cute è popolata da milioni di microrganismi tra cui batteri, funghi e virus che ne costituiscono il microbiota. Come succede nell'intestino, questi microrganismi simbiotici occupano diverse nicchie e proteggono contro l'invasione di molte specie patogene. Inoltre, questi microrganismi possono avere anche un ruolo nell'educare il sistema immunitario, in particolare le cellule T che si ritrovano sulla pelle, inducendolo a rispondere contro l'invasione dei patogeni.

In qualità di organo più ampio del corpo umano, la cute è colonizzata da microrganismi benefici e svolge la funzione di barriera fisica che previene l'invasione di patogeni. In condizioni di rottura della barriera o di uno squilibrio tra commensali e patogeni, vi è l'insorgenza di patologie della pelle e in alcuni casi la comparsa di patologie sistemiche.

Riuscire a preservare dunque questo equilibrio è molto importante in quanto si traduce nel mantenimento dello stato di salute della pelle e dell'intero corpo umano.

Numerosi studi hanno evidenziato l'efficacia dei prebiotici nel promuovere la crescita e l'attività della flora intestinale, in quanto composti fibrosi indigeribili che passano intatti il primo tratto gastrointestinale, e questa loro benefica attività si ripercuote anche su altri organi, tra cui la pelle.

Tra i composti prebiotici si annoverano i galattoooligosaccaridi, importanti carboidrati non digeribili, costituiti da unità di galattosio derivati dal lattosio per l'azione dell'enzima β -galattosidasi. Questo enzima catalizza l'idrolisi del lattosio in glucosio e galattosio ed anche reazioni di transgalattosilazione, con il lattosio come accettore di unità di galattosio, portando alla formazione dei GOS con differenti legami glicosidici e peso molecolare. Numerosi studi hanno dimostrato che il grado di idrolisi e il tipo di transgalattosilazione dei GOS sono differenti e legati alla fonte dell'enzima usato, alla concentrazione del substrato e alle condizioni di reazione. Gli effetti benefici dei GOS sulla salute del sistema gastrointestinale umano sono stati ampiamente dimostrati, tanto da essere usati comunemente come principi attivi di farmaci o ingredienti di alimenti funzionali.

I GOS sono stati ampiamente studiati come prebiotici sulla flora batterica (inducono la crescita e l'attività di bifido batteri e lattobacilli) e come modulatori del sistema immunitario attraverso lo stimolo alla migrazione cellulare. Il meccanismo d'azione proposto riguarda l'interazione con diversi recettori sulla superficie delle cellule epiteliali intestinali, tra cui i Toll-like receptors (TLR). I GOS hanno effetti benefici anche sulla pelle, quando assunti oralmente; essi agiscono mantenendo sana la cute mediante meccanismi che partono dall'intestino, e sono associati alla biodisponibilità di nutrienti con evidenti implicazioni nell'attenuazione degli stati infiammatori e nell'accelerazione dei processi di riparazione a

livello cutaneo. Poco si conosce, invece, dei potenziali effetti diretti dei GOS o di altri composti prebiotici sulla cute e sul suo microbiota. In particolare, non ci sono studi che abbiano caratterizzato l'effetto diretto dei GOS su cheratinociti e fibroblasti, ma possiamo al momento solo evidenziare alcuni dati sui cheratinociti che danno delle buone premesse allo studio. Nella pelle, infatti, i cheratinociti supportano il sistema immunitario mediante l'attività dei TLR e la secrezione di peptidi anti microbici, citochine infiammatorie e chemochine. Ad esempio TLR3 viene attivato in seguito a ferita e attiva l'infiammazione necessaria alla guarigione; TLR2 viene stimolato dalla flora microbica benefica, limita i danni dell'infiammazione e produce sostanze anti microbiche contro la flora patogena. Queste interazioni sono illustrate nella figura 1.

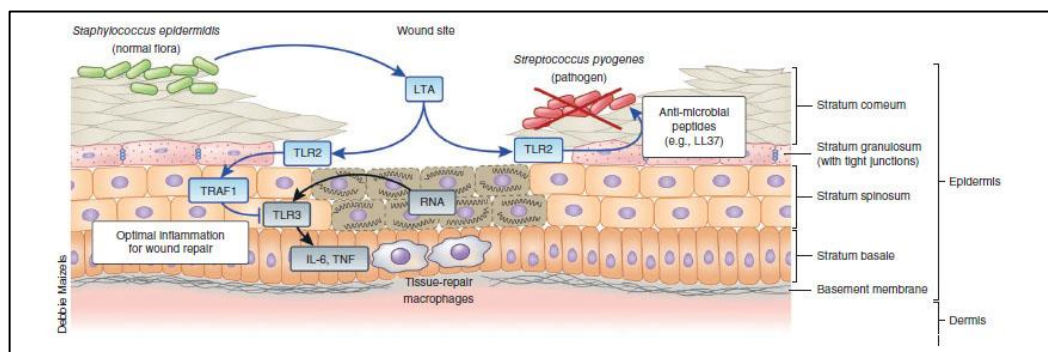


Fig.1. Meccanismi di riparazione delle ferite cutanee.

Scopo del lavoro e Idea innovativa

Scopo del lavoro è stato mettere a punto un principio attivo, a partire da siero, un sottoprodotto derivato dalla lavorazione della Fontina DOP, che fosse in grado di contribuire direttamente al benessere della cute. Il siero della Fontina DOP, un formaggio a pasta dura semi-cotta che deve essere prodotto, in accordo con il disciplinare, da latte crudo intero e proveniente da una sola mungitura di bovine appartenenti alla razza valdostana, è un sottoprodotto liquido ottenuto dalla fermentazione per opera di starter LAB e NLAB e dall'azione di enzimi proteolitici del caglio animale. L'espulsione del siero (sineresi) dalla cagliata avviene a 36°C, in seguito ad una tipologia differente di precipitazione delle caseine, la coagulazione enzimatica, indotta dall'aggiunta di caglio di vitello, contenente l'enzima chimosina. Tale enzima è in grado di idrolizzare l'estremità carica negativamente della κ -caseina, a livello del legame peptidico tra l'amminoacido 105 (Phe) e il 106 (Met), portando alla formazione della para- κ -caseina e il rilascio del glicomacropeptide o caseinomacropeptide (GMP o CMP) nel siero. La κ -caseina idrolizzata, situata sulla superficie delle micelle, ne induce l'aggregazione attraverso l'interazione con i minerali liberi presenti nel latte. La composizione del siero varia a seconda della tipologia (acido o dolce), della specie di origine (vacca, pecora, capra e bufala), l'alimentazione e la fase di lattazione dell'animale.

Il siero dolce, come quello ottenuto dalla lavorazione della Fontina DOP, presenta una colorazione giallastra ed è composto dal 93-94% d'acqua, con una sostanza secca pari a circa il 6-7% i cui costituenti sono sostanzialmente: lattosio (70%), proteine (10%), sali minerali (15% tra cui NaCl, KCl e

principalmente fosfati di calcio) e altri costituenti come lattato e citrato, grassi, composti azotati (urea e acido urico) e vitamine del gruppo B.

Il siero rappresenta circa il 85-95% del volume del latte e ne contiene il 55% dei nutrienti. Sono chiare quindi le sue proprietà nutrizionali, ma allo stesso tempo è importante notare come si tratti di una sostanza altamente inquinante con una richiesta biochimica di ossigeno compresa tra 30 e 60 g/l (BOD, parametro utilizzato per stimare il carico inquinante attraverso una misura indiretta della quantità di O₂ necessaria per l'ossidazione biologica del contenuto di materia organica presente in una soluzione acquosa, in 5 giorni). L'indice di biodegradabilità è stato stimato essere 0.4 – 0.8, attribuibile al contenuto in lattosio e proteine. Considerando che per la produzione di 1 kg di formaggio sono necessari 10 kg di latte, da cui derivano 9 kg di siero, si può affermare che l'industria lattiero-casearia è una delle principali fonti di produzione di effluenti industriali in Europa.

Nell'ottica dell'economia circolare, il presente lavoro propone un uso innovativo del prodotto di scarto della filiera lattiero-casearia della Fontina DOP, il siero, da utilizzare come materia prima per la realizzazione di un prodotto funzionale a livello cutaneo. Per questo lavoro si è preso in considerazione il permeato, cioè la frazione di siero contenente gli zuccheri, ottenuto mediante ultrafiltrazione. Sappiamo dalla letteratura scientifica che il permeato del siero contiene galatto-oligosaccaridi (GOS), potenzialmente bioattivi, sintetizzati in parte dalla ghiandola mammaria bovina, e quindi naturalmente presenti nel latte, ed altri GOS prodotti attraverso reazione enzimatica ad opera di microrganismi, esprimenti l'enzima β -galattosidasi, impiegati nella lavorazione del formaggio Fontina DOP.

Materiali e metodi

La realizzazione di questo prodotto passa attraverso due fasi principali: 1) messa a punto di un processo di ultrafiltrazione per l'estrazione del permeato sierico; 2) messa a punto di un processo di fermentazione del permeato, mediante l'uso di un microrganismo selezionato in Valle d'Aosta, avente caratteristiche genetiche uniche e scelto in base alla capacità di espressione dell'enzima β -galattosidasi, al fine di arricchire il prodotto finito in composti bioattivi.

In particolare, il protocollo di preparazione del principio attivo derivato dal siero di Fontina DOP prevede un pretrattamento del campione che consiste in una chiarificazione per mezzo di precipitazione termocalcica seguita da una microfiltrazione; questo passaggio viene effettuato prima del processo vero e proprio di ultrafiltrazione che serve a separare la componente proteica della matrice da quella zuccherina. Infatti la microfiltrazione preliminare serve a rimuovere dal siero la frazione lipidica, che causerebbe deterioramento delle membrane di ultrafiltrazione. Il protocollo di preparazione e ultrafiltrazione del campione, presentato di seguito, segue il metodo di Fauquant et al. 1985, come modificato da Pereira et al. 2002.

Chiarificazione del siero – il metodo si basa sulla precipitazione termocalcica dei lipidi non centrifugabili. Per questo si porta il valore di Ca²⁺ del siero a 1.2g/l con CaCl₂, quindi si aggiusta il pH del siero ad un range di 7.3-7.5 con NaOH 10N e si procede rapidamente con l'incubazione a caldo alla temperatura di 55°C per 30 min. Al termine si lascia raffreddare a temperatura ambiente e si mette ad incubare a 4-6°C per 72h evitando movimenti che disturbino la formazione del precipitato. Trascorso questo tempo il surnatante viene prelevato e messo a centrifugare a 1600 xg a 4°C per 15 min; questa operazione viene

ripetuta 2 volte, prelevando ogni volta la parte inferiore. Il siero così chiarificato è stato sottoposto a ultrafiltrazione.

Ultrafiltrazione del siero – per l’ultrafiltrazione si è utilizzato un dispositivo di filtrazione a flusso tangenziale Cogent μ Scale (Merck Millipore) con cassetta Pellicon XL in polietersulfene (PES), con superficie di 0,005m² e *cut-off* di 10 kDa. Il flusso di scorrimento è stato fissato a 25 mL/min, con pressione transmembrana di 20 psi e temperatura compresa tra 23,6 e 24,4°C. La parte di siero che ha attraversato la membrana (permeato) è stato raccolto e utilizzato per i successivi passaggi.

Fermentazione del permeato - Il protocollo di fermentazione prevede l'utilizzo del ceppo liofilizzato di *Lactobacillus delbruekii*, ssp unknown, denominato MF-20/7A/24, depositato presso la banca BCCM/LMG (Università di Gent, Belgio). Il ceppo è stato inoculato in terreno di coltura MRS broth e incubato a 40°C per 24 ore. La coltura così ottenuta è stata utilizzata 1:100 per fermentare il permeato sierico, precedentemente filtrato e pastorizzato in autoclave alla temperatura di 90 °C per 20 min. La fermentazione è stata fatta avvenire per 24 ore a 37 °C, al termine della quale, al fine di bloccare il processo, il permeato è stato posto in autoclave a 100 °C per 15 min. Infine il fermentato è stato sottoposto a microfiltrazione (0.22 μ m) per eliminare il residuo microbico.

Caratterizzazione delle componenti del preparato - In seguito alla chiarificazione e al frazionamento del siero, è stata condotta la caratterizzazione delle componenti del permeato per determinare la presenza di molecole potenzialmente bioattive. Sappiamo dalla letteratura scientifica che questo prodotto è composto principalmente da acqua, sali minerali, zuccheri (semplici e complessi) e residui amminoacidici con peso molecolare inferiore a 10 kDa. Si è deciso, quindi, di quantificare inizialmente le componenti solide non grasse (MSNF, milksolids non-fat) attraverso i protocolli ufficiali AOAC per il latte, adattati alla matrice siero:

- Il solido totale è stato quantificato con il metodo AOAC 990.20
- l’analisi del residuo amminoacidico è stata effettuata con il metodo ufficiale Kjeldhal AOAC 991.21 per l’azoto non proteico
- i sali minerali sono stati quantificati con il metodo ufficiale AOAC 945.546
- per le componenti glucidiche sono stati utilizzati i kit Megazyme specifici per lattosio, galattosio e glucosio (cod. K-LOLAC, K-ARGA, GLUHK).

Dalla differenza tra il solido totale e tutte le componenti sopra elencate è stato possibile quantificare indirettamente la quantità di GOS presente nel campione.

È stata effettuata infine una valutazione qualitativa e quantitativa della frazione volatile, al fine di valutare la presenza di ulteriori componenti bioattive quali ad esempio l’acido butirrico, un acido grasso saturo a 4 atomi di carbonio, conosciuto per il suo potenziale terapeutico nel trattamento di disordini metabolici e manifestazioni cancerose attraverso la regolazione epigenetica, l’attivazione di recettori trans-membrana e in quanto fonte energetica per sistemi cellulari eucarioti. Questo passaggio ha previsto l’uso di una metodica cromatografica SPME-GC/MS con utilizzo di una fibra 85 μ m SPME Carboxen/PDMS StableFlexTM e di una colonna DB-Waxcolumn (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m film thickness).

Prima di procedere alla fermentazione del permeato, è stata svolta un'attività di selezione di batteri lattici da poter utilizzare per lo scopo. Per questo sono stati studiati 12 ceppi di *Lactobacillus delbrueckii*, facenti parte della collezione di batteri lattici dell'Institut Agricole Régional, Aosta – Italia, selezionati nel corso degli anni presso alpeggi e piccoli caseifici di produttori valdostani che lavorano il latte seguendo l'antica tradizione di famiglia e senza l'uso di fermenti commerciali, nella zona di produzione della Fontina DOP.

Caratterizzazione genetica – l'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il kit MicroLysis®-Plus (Microzone), seguendo la procedura fornita dal produttore. Qualora l'estrazione non fosse risultata efficiente il campione è stato estratto nuovamente utilizzando il DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), seguendo la metodica per i batteri Gram positivi. Tutti gli estratti di DNA sono stati sottoposti ad analisi DNA barcoding usando i primer universali per batteri lattici, tramite amplificazione PCR e sequenziamento di una porzione della regione 16S codificante per il RNA ribosomiale batterico (16SrDNA). Gli estratti di DNA identificati come *Lactobacillus delbrueckii* sono stati sottoposti ad analisi MLST dopo aver amplificato tramite PCR e sequenziato 8 loci target. Le analisi PCR sono state effettuate impiegando il termociclatore VERITI (Thermofisher Scientific) e seguendo i parametri e le condizioni indicati nell'allegato RD1. I frammenti di DNA sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio, visualizzati tramite transilluminatore a UV e quantificati tramite software GelAnalyzer v. 2010a dopo confronto con frammenti di DNA a lunghezza e concentrazione note (100bp DNA Ladder, Promega). I campioni amplificati sono stati sottoposti a purificazione enzimatica, denaturati, caricati sul Sequenziatore AB3500 Genetic Analyzer (Thermofisher Scientific) e sottoposti ad elettroforesi capillare. Le sequenze ottenute sono state analizzate tramite software SeqA 6 (Thermofisher Scientific) al fine di selezionare solo quelle con un'elevata percentuale di basi aventi un Quality Value (QV) >20. Al fine di valutare le specie di appartenenza, tutte le sequenze ottenute sono state sottoposte ad analisi tramite BLAST in GenBank (www.blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi). Infine per ogni locus, le sequenze ottenute sono state allineate tramite il software MEGA 7 v.7.0.26 per evidenziare gli eventuali polimorfismi a livello intraspecifico ed individuare gli aplotipi presenti. Inoltre le sequenze di ciascun locus sono state concatenate ed allineate con altre sequenze specifiche presenti in GenBank; sono così state calcolate le matrici di distanza che hanno permesso di ottenere dendrogrammi utili a valutare visivamente gli aplotipi individuati e la loro distanza filogenetica.

Test in vitro su modelli cellulari - sono state testate le caratteristiche del preparato fermentato e non fermentato su linee cellulari di cheratinociti umani HaCat di cui abbiamo informazioni riguardanti i pathway molecolari su cui agiscono le biomolecole di nostro interesse. La linea cellulare deriva da pelle adulta che mantiene completa capacità di differenziazione epidermica ed è rappresentativa del tessuto (cute), su cui verrà applicato il prodotto. In base alle osservazioni pubblicate sull'epitelio intestinale, ipotizziamo che, in vitro, il fermentato arricchito in componenti bioattive vada a stimolare i TLR dei cheratinociti e induca il segnale infiammatorio positivo, che migliora la chiusura della ferita. Per questo fine sono stati testati il permeato non fermentato, il permeato fermentato con LB MF-20/7A/24, e come controlli positivi, un preparato commerciale contenente GOS (Galenico) e acido butirrico alla stessa concentrazione presente nel campione fermentato. Su tutti i campioni sono stati eseguiti i seguenti test in vitro:

-Valutazione della tossicità - verificata con i saggi MTT, Neutral Red Uptake (NRU), Cristal Violetto e rilascio di LDH. Il SDS è stato usato come controllo positivo di tossicità.

VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA'	
TEST	SCOPO DELL'ANALISI
CRISTAL VIOLETTO	Valutazione del potenziale di inibizione della <u>crescita fisiologica</u> della cute e delle mucose attraverso l'utilizzo del colorante CV, idrosolubile, con affinità nucleare: la colorazione, misurata spettrofotometricamente, è proporzionale al numero di cellule -Fig8
LDH LEAKAGE	Saggio colorimetrico per la quantificazione della <u>mortalità</u> e della lisi cellulare, basato sull'attività enzimatica della LDH (lattato deidrogenasi) rilasciata dal citosol al surnatante dalla cellula danneggiata - Fig 9
ATTIVITA' INTRACELLULARE DI LDH	L'attività enzimatica presa in considerazione rappresenta un indice del <u>metabolismo energetico</u> cellulare (glicolisi e fosforilazione ossidativa). Con questo saggio si valutano eventuali alterazioni dovute alla presenza del prodotto testato
MTT	Test di <u>sopravvivenza cellulare</u> che sfrutta l'azione degli enzimi deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali di scindere la molecola MTT in formazano (giallo → violaceo), detectabile allo spettrofotometro. Un aumento o una diminuzione delle cellule vitali ha per risultato un cambiamento concomitante nella quantità di formazano che si forma e che può essere considerato come un indicatore del grado di citotossicità causato dall'esposizione alla sostanza in esame – BREVE E LUNGO TERMINE
NEUTRAL RED UPTAKE	<u>Potenziale irritazione cutanea</u> misurata sulla base della capacità delle cellule vitali di legare il NR, un colorante carico positivamente che diffonde facilmente attraverso le membrane cellulari e, accumulandosi nel citosol, viene incorporato nell'ambiente acido dei lisosomi. Solo le cellule con la membrana plasmatica intatta saranno in grado di trattenere il NR– BREVE E LUNGO TERMINE

-Valutazione dell'effetto biologico - verificato mediante il test di Wound healing, utilizzando come controllo positivo il TGF β ; l'espressione genica e l'espressione proteica.

VALUTAZIONE DELL' EFFETTO BIOLOGICO	
TEST	SCOPO DELL'ANALISI
WOUND HEALING	Dopo la creazione di una ferita (spazio vuoto), su cellule in monostrato a confluenza, si misura la capacità di <u>movimento cellulare</u> con conseguente chiusura del taglio creato: vengono scattate fotografie dal tempo 0 fino alle 24 ore successive, per calcolare la percentuale di chiusura della ferita per mezzo di un software - Fig10
ESPRESSIONE GENICA	Analisi trascrizionale (RT-qPCR) per indagare i <u>meccanismi molecolari</u> responsabili della chiusura della ferita: • Produzione di energia (l'amplificazione dei trascritti delle subunità proteiche COX II e MT-ATP6, derivanti dal DNA mitocondriale, rappresenta un indice dell'espressione delle proteine mitocondriali coinvolte nella produzione di energia necessaria al movimento) • Variazioni nella trascrizione dei geni coinvolti nell'adesione cellulare (la E-caderina è la proteina responsabile delle giunzioni cellula-cellula nell'epitelio, mentre la Vimentina è una proteina tipica delle cellule non differenziate) • Produzione di citochine infiammatorie che hanno un effetto positivo sulla guarigione delle ferite (interleuchine IL-6, IL-8, IL-24 e TNF-α) • Trascrizione dei geni marker del differenziamento cellulare (involucrina, cheratina 1 e cheratina 10)

ESPRESSIONE PROTEICA

Dopo aver separato le frazioni citosol, mitocondrio e nucleo, viene utilizzata la tecnica del western blotting per analizzare la via di segnalazione molecolare che media l'effetto del fermentato. Si valuta, nello specifico, la traslocazione del fattore trascrizionale NFkB dal citosol al nucleo e del fattore trascrizionale FOXO-1 dal mitocondrio al nucleo, dove inducono, rispettivamente, la produzione di IL-8 (promozione della risposta infiammatoria) e un'aumento della respirazione mitocondriale.

Valutazione del potere irritante in soggetti con pelle sensibile - Si definisce cute sensibile, reattiva o iper-reattiva una cute soggetta a sensazioni sgradevoli quali pizzicore, bruciore, dolore, prurito, o formicolio in risposta a stimoli che normalmente non dovrebbero provocare tali sensazioni, per esempio raggi UV, aria calda e secca, aria fredda ed umida, vento, smog/inquinanti, contatto con acqua, utilizzo di saponi o cosmetici, stress psichico. Non si può parlare di cute sensibile quando queste sensazioni sgradevoli sono attribuibili alla presenza di una patologia cutanea.

Oltre alle sensazioni sgradevoli, la cute può apparire eritematosa, anche se spesso mantiene un aspetto normale. In qualsiasi sede corporea può essere presente cute sensibile, ma la localizzazione al volto è la più frequente.

Si stima che circa il 50% della popolazione europea soffra di iper-reattività cutanea con una maggior prevalenza nel sesso femminile (60%). Questi soggetti sono più a rischio, rispetto alla popolazione generale, di sviluppare dermatiti di tipo irritativo al contatto frequente o prolungato con cosmetici e prodotti per l'igiene personale.

L'obiettivo dello studio è la valutazione del potere irritante del permeato sierico fermentato in soggetti (volontari adulti maggiorenni di entrambi i sessi) con cute sensibile, tramite test epicutanei a lettura ritardata (patch test).

La selezione dei volontari è stata condotta utilizzando due approcci combinati:

- Il test di autovalutazione (Misery modificato).
- Il test all'acido lattico o test di Ramette ("*stinging test*").

Il test all'acido lattico o test di Ramette consiste nell'applicare con cotone idrofilo, in regione zigomatica, una soluzione acquosa di acido lattico al 15%, ed in sede controlaterale, come controllo, acqua distillata. La comparsa di senso di bruciore (*stinging*) indica presenza di irritazione soggettiva, pur in assenza di qualsiasi tipo di reazione cutanea visibile. Dopo 2 e 5 minuti dall'applicazione dell'acido lattico il soggetto in esame assegnerà un punteggio da 0 a 3 al bruciore avvertito sulla base dell'intensità.

0 = assenza di sensazioni anomale

1 = sensazione di calore-bruciore leggera

2 = sensazione di calore-bruciore moderata

3 = sensazione di calore-bruciore intensa

Sono considerati "STINGER" i volontari che presentano un punteggio cumulativo (dopo 2 e 5 minuti) ≥ 3 .

Viene posta diagnosi di cute sensibile/ipер-reattiva nei soggetti che si considerino soggettivamente affetti da cute sensibile rispondendo in maniera affermativa alla domanda "ritiene che la sua cute sia sensibile?" e che riportino un punteggio cumulativo ≥ 3 al questionario di autovalutazione ed un punteggio ≥ 3 al test dell'acido lattico.

I prodotti da testare vengono registrati su apposita scheda al momento dell'arrivo e conservati a temperatura ambiente.

Su ogni soggetto viene testata contemporaneamente una serie di non più di 48 prodotti. Per ciascun volontario viene compilata una scheda operativa su cui indicare la data del test, i prodotti testati. Questa scheda sarà utilizzata anche per registrare i risultati finali del test.

Ogni prodotto è testato in singola dose (10 µl) su 20 volontari. I campioni vengono posti in *Finn chambers* di alluminio (Bracco), che sono applicate alla cute della superficie volare dell'avambraccio con cerotto poroso, protette da cerotto adesivo ipoallergenico Fixomul.

I cerotti con i campioni vengono lasciati in situ per 48 ore, ricordando al paziente di non lavare/bagnare la zona per l'intera durata del test. La rimozione è eseguita dallo sperimentatore, che provvede a ripulire le aree di applicazione da eventuali residui di prodotto. La lettura dei risultati viene fatta 15 minuti e 24 ore dopo la rimozione dei prodotti, ovvero dopo 48 e 72 ore dalla loro applicazione.

Scala di valutazione delle dermatiti irritative da contatto

Assente → 0

Lieve → 1

Moderata → 2

Severa → 3

Si esegue la media matematica degli indici di irritazione ottenuti nei 20 test.

Il prodotto viene quindi classificato secondo la modalità seguente:

Indice medio di irritazione: <0.5	NON irritante
Indice medio di irritazione: 0.5-20	LEGGERMENTE irritante
Indice medio di irritazione: 20-50	MODERATAMENTE irritante
Indice medio di irritazione: 50-80	FORTEMENTE irritante

Risultati

Caratterizzazione biochimica - Dalla quantificazione dei solidi nel permeato fermentato e non fermentato, per sottrazione, è stato possibile determinare la quantità percentuale di GOS presenti (tabella 1); dai risultati ottenuti si evince che questo tipo di fermentazione non ha portato ad un

arricchimento di tali componenti, ma probabilmente ad una modifica strutturale degli stessi. A questo proposito è utile ricordare che i GOS che originano dalla ghiandola mammaria presentano una struttura ramificata, mentre quelli di origine batterica, possono avere soltanto conformazione lineare.

	P	PF
	% (w/v)	% (w/v)
Solido Totale	6,71	6,36
Sali minerali	1,14	1,54
Lattosio	1,98	1,62
Galattosio	0,25	0,24
Glucosio	0,004	0,001
peptidi	0,038	0,034
Σ	3,42	3,43
GOS	3,29	2,93

Tab. 1. Risultati della quantificazione dei solidi (% w/v) nel permeato sierico (P) e nel permeato sierico fermentato (PF) con LB MF-20/7A/24.

La quantificazione dell'acido butirrico ha portato ad un risultato interessante; mentre nel permeato sono presenti 0.00153 g/l, dopo la fermentazione con il LB MF-20/7A/24 si raggiunge un valore di 0.00514 g/l, equivalenti rispettivamente a 0.52 μ M e 1.75 μ M (Figura 2), mostrando come il processo di fermentazione porti ad un incremento statisticamente significativo ($p < 0.05$).

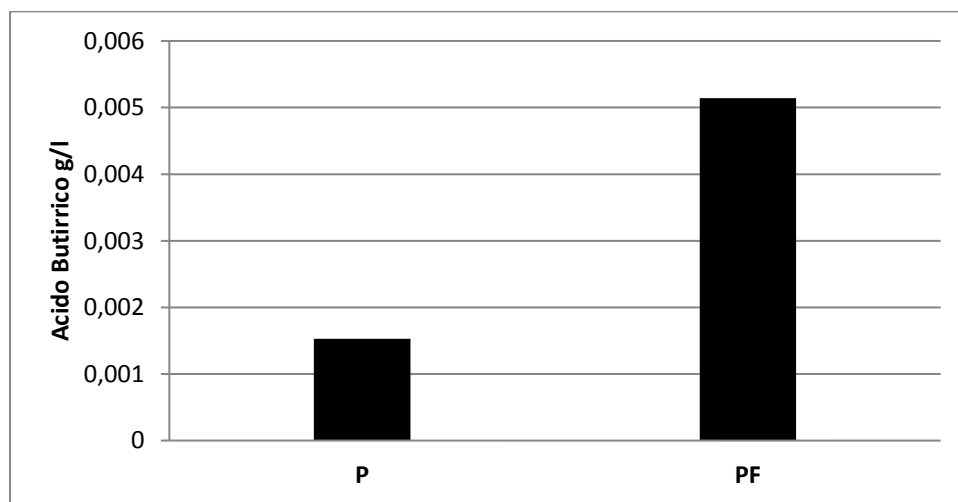


Fig. 2. Concentrazione di acido Butirrico nei campioni di Permeato sierico non fermentato (P) e fermentato (PF) con il microrganismo LB MF-20/7A/24.

Caratterizzazione genetica – l’analisi del DNA barcoding ha permesso di confermare l’appartenenza del ceppo MF-20/7A/24 alla specie *Lactobacillus delbrueckii*. L’analisi del MLST ha evidenziato, inoltre, l’appartenenza del suddetto ceppo all’aplotipo B, molto diverso da altri ceppi analizzati.

ID ceppo	LAB	clpX	dnaA	groEL	murE	pheS	pyrG	recA	rpoB	
17QU1MRS	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
18QU1MRS	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
19QU1MRS	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
20QU1MRS	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
21QU1MRS	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
22QU2MRSh24	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
23QU1MRS/14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
66QU1MRS/60	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
67QU1MRS/60	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
2 MRSPRAL	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
5 MRSPRAF24	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
6 MRSPRAF24	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
7 MRSPRAF24	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
8 MRSPRAF24	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
MF-20/7A/24	A	B	B	B	B	A	B	B	B	B
21/7A/24	A	B	B	B	B	A	B	B	B	
6UC	B	C	C	B	C	B			C	C
10UC	B	C	C	B	C	B	B	B	C	
6 Y450B	B	C	C	B	C	B	B	B	C	

Allineando le sequenze concatenate dei diversi aplotipi con quelle di altri ceppi appartenenti alle diverse sottospecie di *L. delbrueckii* presenti in GenBank è stato creato un albero filogenetico che ha evidenziato che l’aplotipo B è vicino ad un ceppo appartenente alla sottospecie *indicus*, pur essendo diverso (Figura 3).

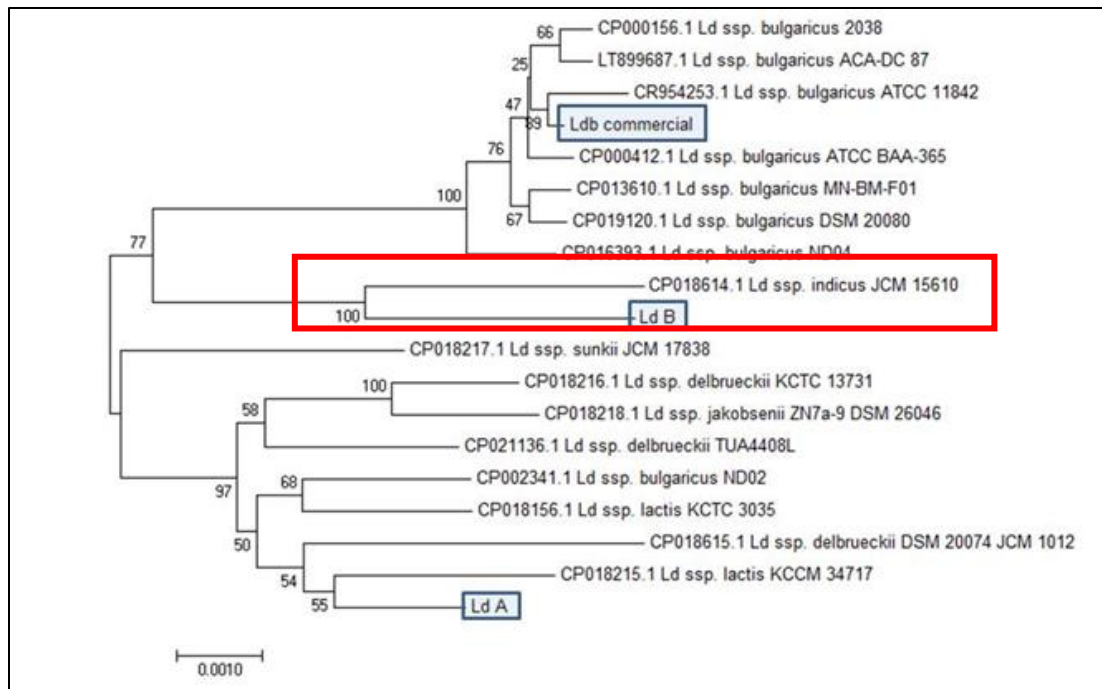


Fig.3. Albero filogenetico ottenuto allineando le sequenze concatenate degli diversi aplotipi con quelle di altri ceppi appartenenti alle diverse sottospecie di *L. delbrueckii*. Nel riquadro rosso è mostrato l'aplotipo B e la sua vicinanza con la *ssp indicus*.

Test in vitro su modelli cellulari - Sulla base dei test cellulari effettuati, nessuno dei due prodotti, permeato e permeato fermentato, è citotossico e nessuno interferisce con la crescita e il metabolismo energetico citoplasmatico dei cheratinociti umani (Figura 5 e 6).

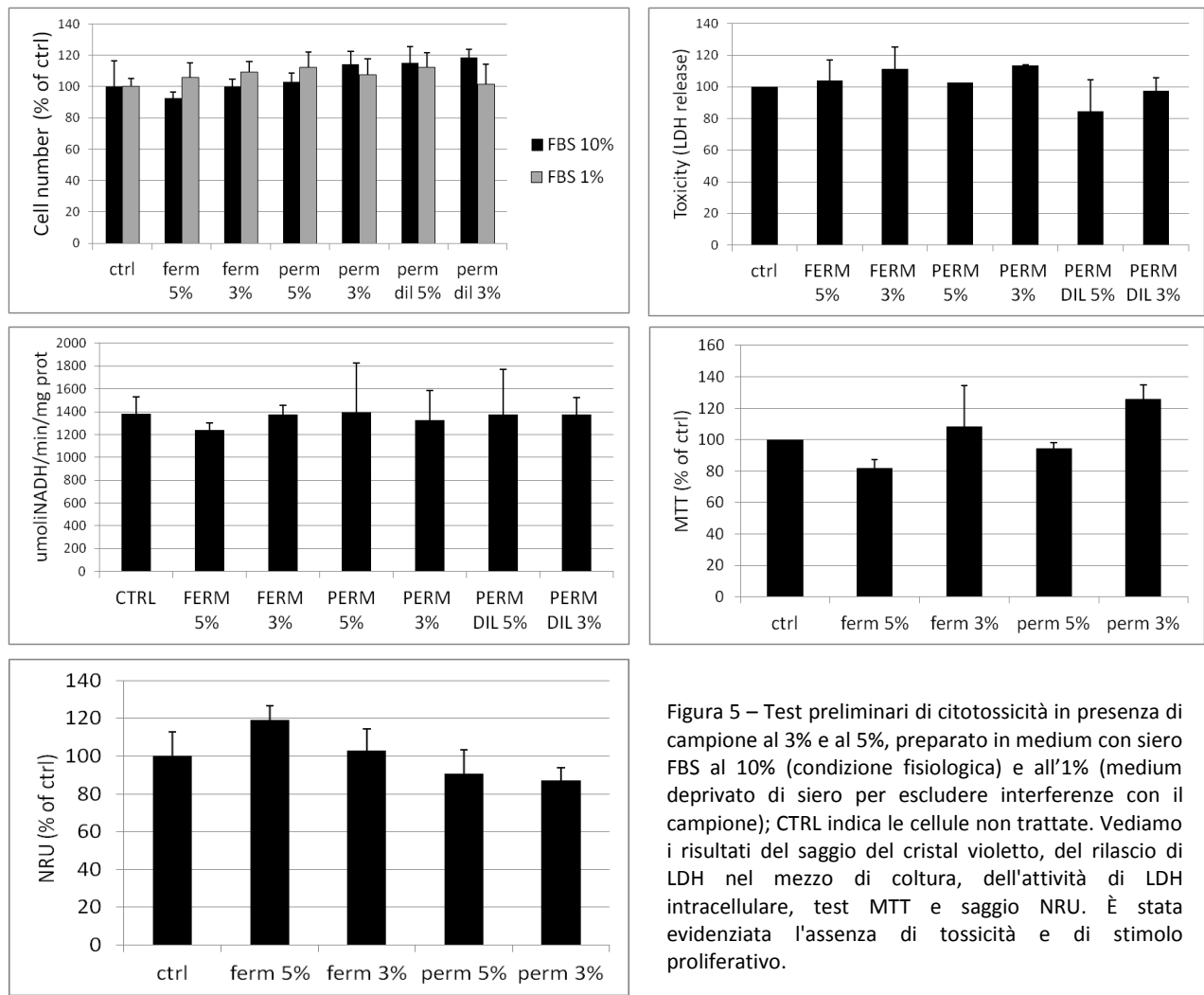


Figura 5 – Test preliminari di citotossicità in presenza di campione al 3% e al 5%, preparato in medium con siero FBS al 10% (condizione fisiologica) e all'1% (medium deprivato di siero per escludere interferenze con il campione); CTRL indica le cellule non trattate. Vediamo i risultati del saggio del cristal violetto, del rilascio di LDH nel mezzo di coltura, dell'attività di LDH intracellulare, test MTT e saggio NRU. È stata evidenziata l'assenza di tossicità e di stimolo proliferativo.

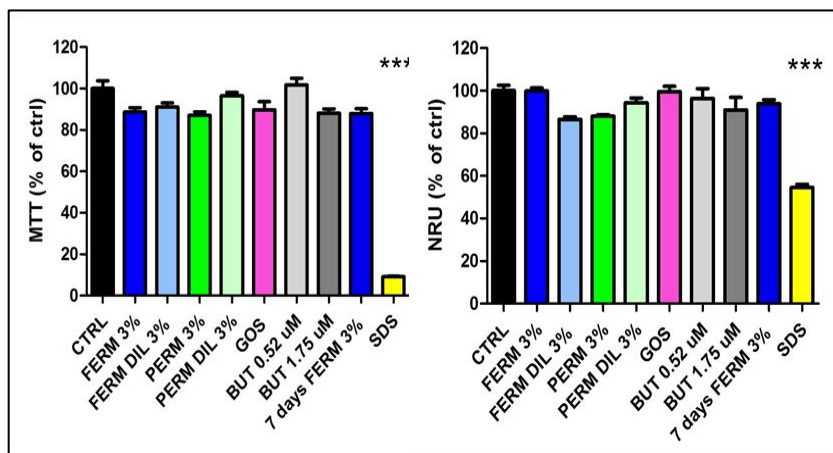
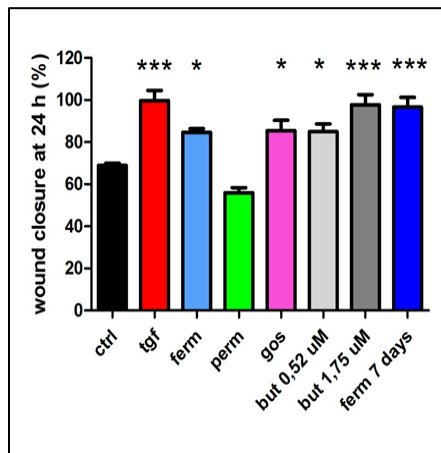


Figura 6 – Test di citotossicità valutata sul lungo termine, il trattamento per 7 giorni mima l'utilizzo di una crema. Permeato e fermentato sono stati testati anche diluiti 1:100. Gos commerciali a composizione simile al fermentato e butirrato sono stati testati come confronto. SDS rappresenta un controllo positivo di tossicità. Vediamo i risultati del test MTT (A) e saggio NRU (B). Non si evidenzia tossicità in nessuna condizione, tranne in presenza di SDS.



Il dato molto interessante che emerge dal test *wound healing* ci dice che il fermentato ha un effetto positivo sulla chiusura delle ferite. Al contrario il permeato non dimostra queste proprietà. Il fermentato contiene butirrato ad una concentrazione che, testata da sola, è positiva per la chiusura della ferita. Queste osservazioni sono una novità in campo scientifico poiché i GOS e l'acido butirrico (molecola notoriamente prodotta dalla microflora intestinale e cutanea) sono stati fin ora indagati per lo più come effetti intestinali (Figura 6 e 7).

Figura 7 - Sono mostrati i risultati del saggio di wound healing. Il trattamento con TGF beta rappresenta un controllo positivo del test (stimolo alla chiusura). Rispetto al CTRL, solo il permeato rallenta la chiusura.

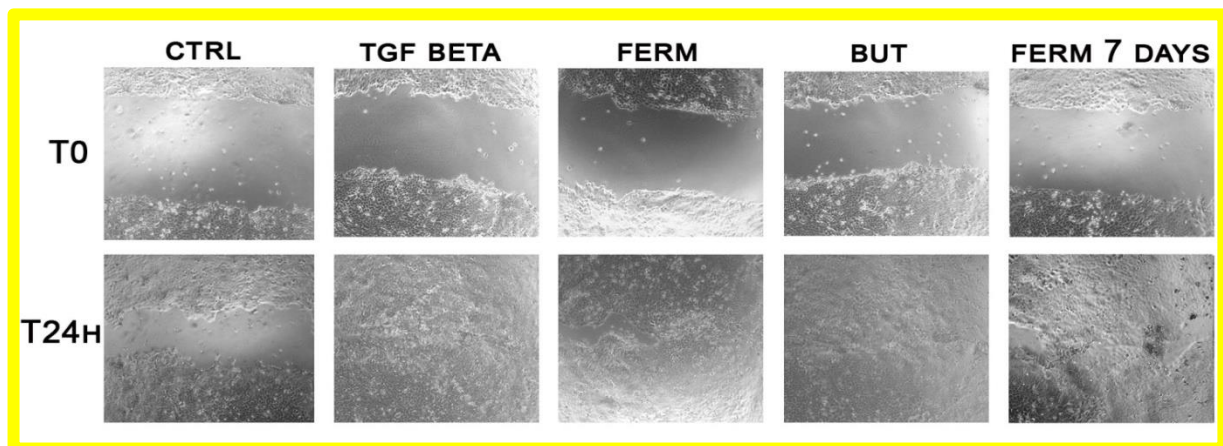


Figura 7 – Immagini relative al saggio del wound healing (chiusura della ferita)

Per quanto riguarda il contatto cellula-cellula, tutti i campioni tranne il permeato riducono la trascrizione di E-Caderina, la proteina responsabile dell'adesione tra cellule nell'epitelio. Come conseguenza le cellule sono più libere di muoversi. Nel saggio è stato valutato l'effetto del TGF- β , una citochina che modifica le caratteristiche dell'epitelio e promuove la perdita del differenziamento (transizione epitelio-mesenchimale): TGF- β riduce la E-Caderina, ma aumenta la Vimentina.

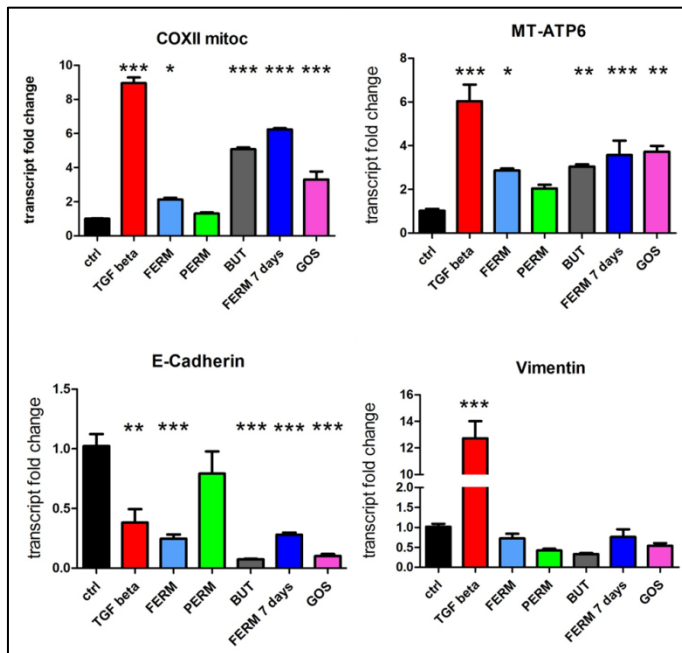


Figura 8 – Trascrizione dei geni coinvolti nella produzione di energia (in alto) e nel contatto cellula-cellula (in basso). TGF beta è il controllo positivo.

Il permeato fermentato aumenta più degli altri campioni la trascrizione di IL-8. Sulle cellule sane l'effetto di induzione sulla citochina è in generale modesto (espressione triplicata), mentre sul campione contaminato da micoplasma, infezione molto comune nella pelle, il fermentato potenzia enormemente la produzione di IL-8 (200 volte più alta rispetto al controllo).

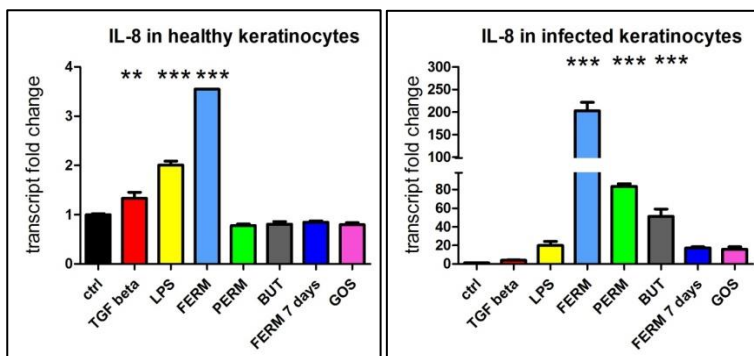


Figura 9 - Analisi trascrizionale del gene codificante per IL-8, in cellule sane e infettate da micoplasma. Si evidenziano differenze nella modulazione del gene. LPS: lipopolisaccaride, componente batterica infiammatoria, utilizzata come controllo positivo. TGF: citochina che non dovrebbe indurre una risposta infiammatoria, utilizzata come controllo negativo.

Vediamo infine che vengono aumentate le proteine del differenziamento. Abbiamo così un'ulteriore conferma del fatto che le cellule non vadano in contro a transizione epitelio-mesenchimale (Figura 10).

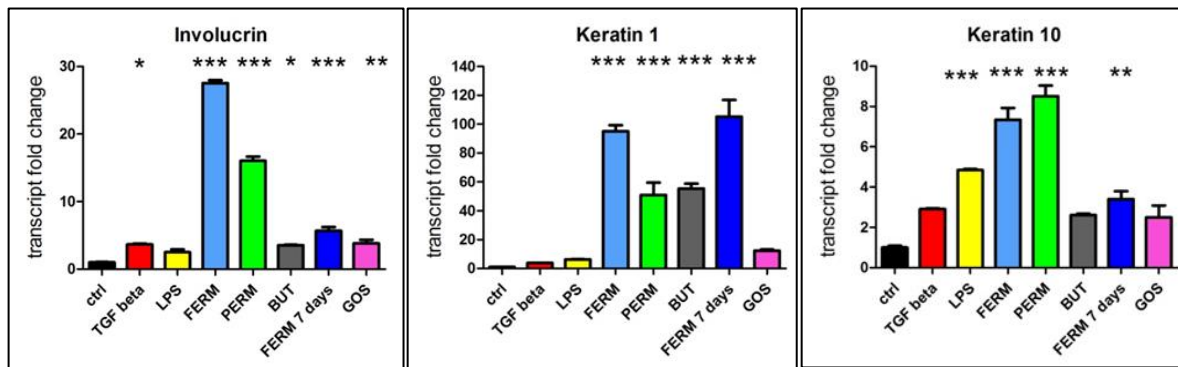


Figura 10 – Analisi trascrizionale dei geni coinvolti nel differenziamento dei cheratinociti

Con gli esperimenti che analizzano la trascrizione genica sono stati approfonditi i meccanismi molecolari alla base della chiusura della ferita: quando una ferita si chiude le cellule dell'epitelio si muovono e partecipano allo stimolo infiammatorio. Per muoversi devono variare la gestione dell'energia (aumenta l'ATP) e devono perdere i contatti cellula-cellula. È emerso come tutti i campioni (fermentato e controlli positivi) tranne il permeato inducono la trascrizione dei geni mitocondriali che codificano per la produzione di energia. Inoltre, tutti i campioni tranne il permeato inducono la trascrizione dei geni mitocondriali che codificano per le proteine della fosforilazione ossidativa mitocondriale. Il risultato è l'aumento della produzione di energia. Inoltre, tutti i campioni tranne il permeato riducono la trascrizione di E-Cadherin, la proteina responsabile dell'adesione cellula-cellula nell'epitelio. Come conseguenza le cellule sono più libere di muoversi.

I dati degli ultimi esperimenti mostrati dimostrano che i GOS inducono la produzione di IL-8, una citochina con effetti benefici sulla chiusura delle ferite. Infine, vengono aumentate le proteine del differenziamento, quindi viene favorita la formazione di una buona barriera epidermica.

Queste osservazioni sono una novità in campo scientifico poiché i GOS e il butirrato (molecola prodotta dalla microflora intestinale e cutanea) sono stati fin ora indagati per lo più come effetti intestinali.

Poiché dalla letteratura scientifica si sa che le citochine infiammatorie vengono prodotte dopo stimolazione dei TLR (Toll-like Receptors) e con una via di segnalazione mediata dal fattore trascrizionale NF-κB, lo schema del meccanismo di azione dei GOS è il seguente:

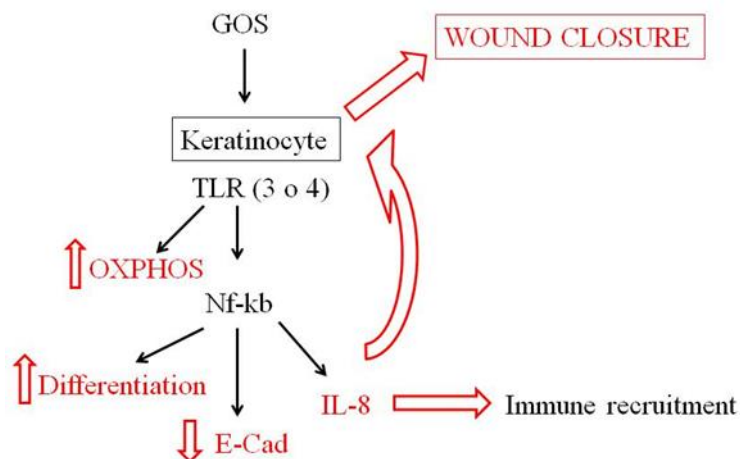


Figura 11 – Pathway molecolare dei GOS. OXPHOS: respirazione mitocondriale. IL-8 ha un'azione paracrina, ovvero agisce localmente e su diversi tipi cellulari, inoltre promuove il movimento e la chiusura della ferita.

Attraverso l'analisi dell'espressione proteica è stato possibile confermare che il segnale del fermentato, mediato dai GOS ed incrementato dalla presenza dell'acido butirrico, sia dovuto all'attivazione del fattore trascrizionale NF-kb, responsabile della produzione di IL-8, con conseguente promozione della risposta infiammatoria. Parallelamente, abbiamo indagato l'aumento della respirazione mitocondriale, valutando la migrazione di FOXO-1 dal mitocondrio, in cui si localizza per reprimere la respirazione, al nucleo.

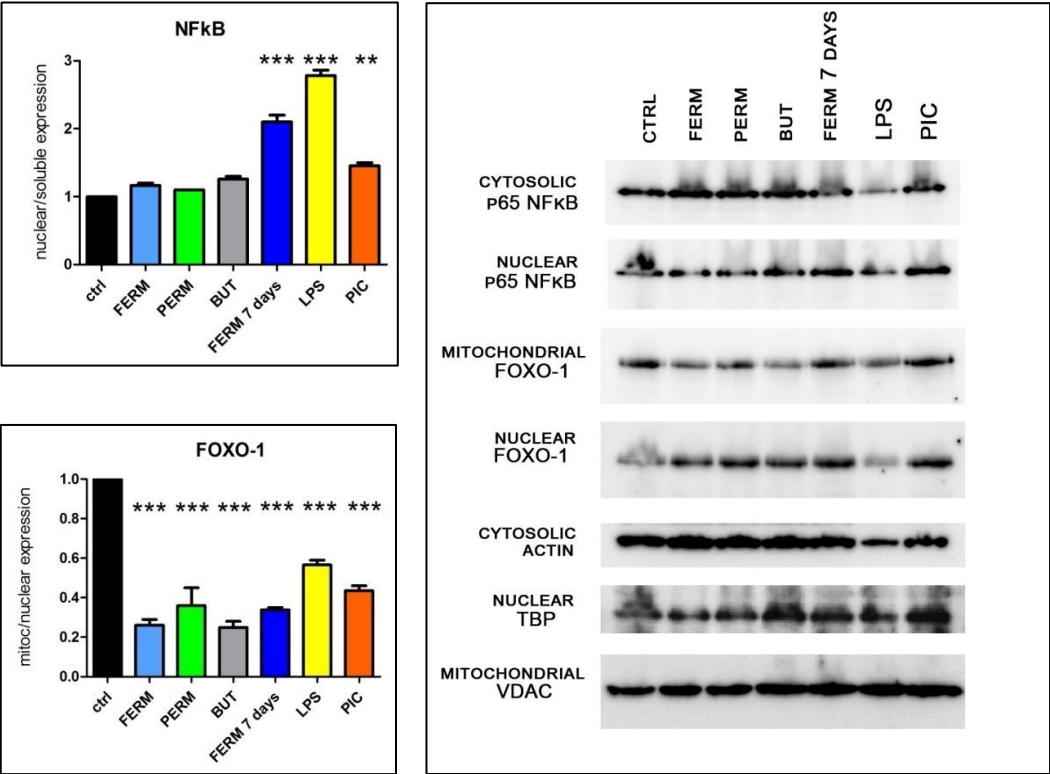


Figura 12 – Studio dell'espressione proteica. PIC (Poly I.C) è un RNA a doppia elica in grado di stimolare il Toll-like receptor 3 (TLR 3).

Valutazione del potere irritante in soggetti con pelle sensibile - Dallo studio del cosmetico messo a punto a partire dal principio attivo creato in laboratorio è emerso che il prodotto non è irritante ed inoltre risulta essere adatto alle pelli sensibili. Nella tabella e nelle figure che seguono sono mostrati i risultati del patch test.

Volont. n°	Eta' (Age)	Sesso (Sex)	ERITEMA (erythema/erythème)		EDEMA (oedema/oedème)		VESCICOLE (blisters/vesicles)	
			15'	24h	15'	24h	15'	24h
1	27	M	0	0	0	0	-	-
2	22	F	0	0	0	0	-	-
3	22	M	0	0	0	0	-	-
4	24	M	0	0	0	0	-	-
5	25	F	0	0	0	0	-	-
6	24	M	1	1	0	0	-	-
7	34	F	0	0	0	0	-	-
8	22	F	1	1	0	0	-	-
9	21	F	1	1	0	0	-	-
10	22	F	1	1	0	0	-	-
11	22	F	0	0	0	0	-	-
12	25	F	0	0	0	0	-	-
13	24	F	0	0	0	0	-	-
14	21	F	0	0	0	0	-	-
15	24	F	1	1	0	0	-	-
16	24	F	0	0	0	0	-	-
17	21	F	0	0	0	0	-	-
18	26	F	1	1	0	0	-	-
19	21	F	0	0	0	0	-	-
20	23	F	0	0	0	0	-	-

Tabella 3. Risultati del Patch test eseguiti su 20 volontari.

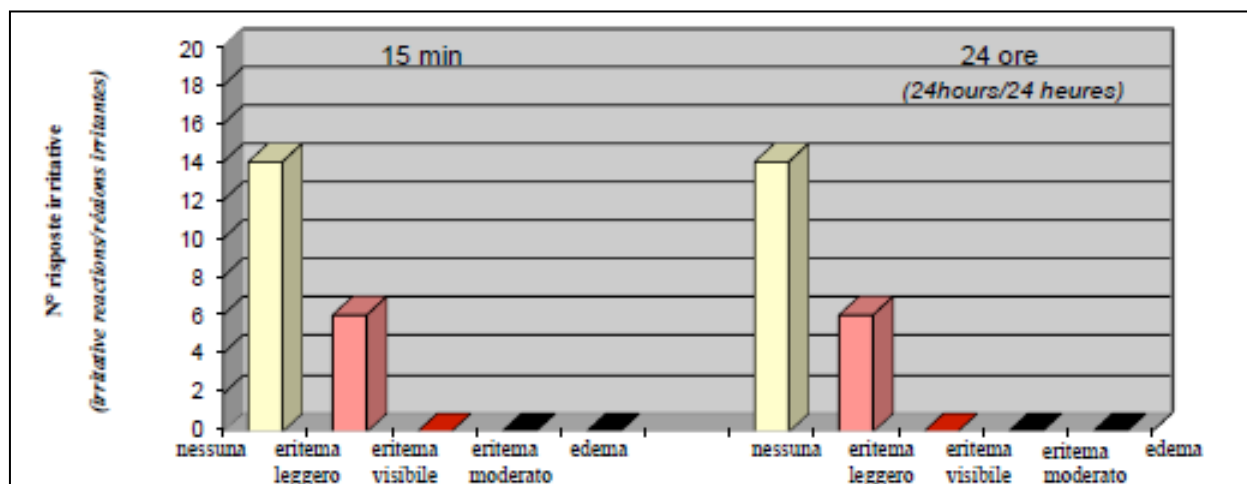


Figura 13. Tipologie di risposta irritativa.

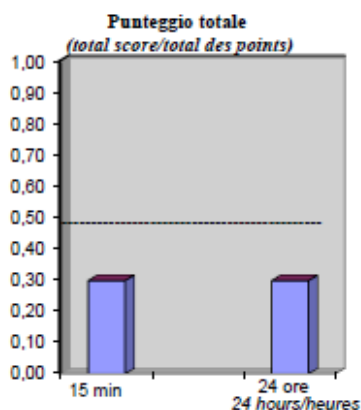


Figura 14. Indice di irritazione medio.