

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA E SCIENZE DELLA SALUTE
“V. TIBERIO”



Dottorato di Ricerca in Medicina Traslazionale e Clinica
XXXVIII Ciclo

Tesi in Microbiologia e Microbiologia Clinica (MEDS-03A)

“Galleria mellonella come modello preclinico alternativo per lo screening funzionale dei Lactic Acid Bacteria: valutazione di attività immunomodulatorie e antimicrobiche”

Tutor:

Chiar.mo Prof. *Roberto DI MARCO*

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. *Giovanni SCAPAGNINI*

Dottorando:

Antonio GUARNIERI

Matricola 176196

Anno Accademico 2024/25

INDICE

INTRODUZIONE	5
Il microbiota umano.....	5
Composizione e ruolo fisiologico	5
Interazione microbiota-ospite: omeostasi immunitaria e disbiosi intestinale	6
“ <i>Lactic acid bacteria</i> ”: caratteristiche biologiche e ruolo funzionale	8
Generalità e classificazione	8
I batteri lattici e il loro utilizzo come probiotici: termini e requisiti funzionali.....	10
Meccanismi di azione probiotica.....	12
Vescicole extracellulari batteriche: panoramica e attività biologica.....	15
Modelli sperimentali preclinici nel contesto regolatorio: approcci alternativi per lo screening funzionale dei probiotici.....	17
Modelli <i>in vitro</i> : utilità e limiti.....	17
Modelli animali vertebrati: valore informativo e vincoli di traslabilità e scalabilità	19
Contesto regolatorio e principio delle 3R: implicazioni operative per la ricerca preclinica	20
Modelli invertebrati e razionale d’uso nello screening funzionale	21
<i>Galleria mellonella</i>	22
Caratteristiche biologiche e ciclo vitale	22
Barriere fisiche e difesa basale.....	24
Risposta immunitaria cellulare: emociti e funzioni effettrici.....	26
Risposta immunitaria umorale: peptidi antimicrobici e melanizzazione	27
Vie di segnalazione immunitaria conservate.....	29
RAZIONALE	30
SCOPO	31
MATERIALI E METODI	33
Sostanze chimiche e materiali	33
Coltivazione dei ceppi batterici e preparazione degli inoculi	35
Acquisizione e allevamento delle larve di <i>Galleria mellonella</i>	37
Analisi statistica	38
Attività 1: Valutazione funzionale <i>in vivo</i> della risposta immunitaria innata ai batteri lattici nel modello preclinico <i>Galleria mellonella</i> : confronto tra <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> e <i>Lentilactobacillus kefir</i>	39
Razionale dello studio	39
Risultati	47

Discussione.....	62
Attività 2: Studio dei batteri lattici isolati dal latte materno umano: valutazione dell'attività antimicrobica e della modulazione immunitaria nel modello di ferita da ustione in <i>Galleria mellonella</i>	73
Razionale dello studio	73
Risultati	79
Discussione.....	87
Attività 3: L'assunzione preventiva per via orale di <i>Limosilactobacillus fermentum</i> DMS 34872 risulta protettiva per <i>Galleria mellonella</i> nei confronti di patogeni legati al tratto intestinale.	91
Razionale dello studio	91
Risultati	98
Discussione.....	105
Materiali supplementari.....	110
Attività 4: Isolamento e caratterizzazione delle vescicole extracellulari prodotte da <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	111
Razionale dello studio	111
Risultati	118
Discussione.....	122
CONSIDERAZIONI FINALI	124
LIMITI DELLO STUDIO	126
PROSPETTIVE FUTURE	128
BIBLIOGRAFIA	132

INTRODUZIONE

Il microbiota umano

Composizione e ruolo fisiologico

Il microbiota umano è definito come l'insieme dei microrganismi, comprendenti batteri, archea, virus e miceti, che colonizzano stabilmente le superfici e le cavità di un organismo, instaurando con l'ospite relazioni di tipo mutualistico, commensale (eubiosi) o potenzialmente patogeno in condizioni di squilibrio (disbiosi) (Gilbert et al., 2018). Il termine microbioma, invece, si riferisce al patrimonio genetico complessivo di tale comunità, consentendo di distinguere la composizione tassonomica dall'attività biologica, spesso caratterizzata da ridondanza funzionale tra individui con microbioti differenti (Hou et al., 2022). Il corpo umano ospita comunità microbiche altamente diversificate, distribuite in nicchie anatomiche ben definite quali, ad esempio, cute e annessi cutanei, vie respiratorie, tratto urogenitale e tratto gastrointestinale. Tra questi, il microbiota intestinale rappresenta il compartimento quantitativamente e funzionalmente più rilevante ed è costituito prevalentemente da batteri appartenenti ai phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria. La colonizzazione ha inizio già nelle ultime fasi della permanenza intrauterina e subisce profonde modificazioni durante tutto l'arco della vita. La sua composizione è infatti influenzata da fattori fisiologici e ambientali, esposizione a farmaci, età, dieta, stile di vita, modalità del parto e allattamento (Hou et al., 2022). Nonostante l'elevata variabilità interindividuale, esso mantiene una relativa stabilità funzionale, assicurando processi fondamentali per l'ospite quali la fermentazione dei substrati non digeribili, la sintesi vitaminica, la regolazione del metabolismo energetico e il mantenimento dell'integrità della barriera intestinale (Lynch and Pedersen, 2016). Alterazioni qualitative o quantitative di queste comunità, definite disbiosi, sono state associate a numerose condizioni patologiche, incluse malattie infiammatorie croniche intestinali, disturbi metabolici, infiammazione sistemica e disfunzioni immunitarie, suggerendo che il ruolo chiave del microbiota nella patogenesi di tali condizioni (Lynch and Pedersen, 2016; Hou et al., 2022).

Interazione microbiota-ospite: omeostasi immunitaria e disbiosi intestinale

L'interazione microbiota-ospite costituisce un determinante centrale dell'omeostasi fisiologica e immunitaria, poiché le comunità microbiche residenti non si limitano a coesistere con l'organismo, ma contribuiscono in modo attivo alla calibrazione delle risposte immunitarie locali e sistemiche attraverso segnali strutturali e metabolici (Didriksen et al., 2024). In particolare, l'epitelio intestinale oltre a rappresentare una barriera fisica, integra segnali biochimici derivanti dal lume e li traduce in risposte immunitarie tramite la produzione di muco, peptidi antimicrobici, citochine e metaboliti, orchestrando il reclutamento e la funzione di cellule innate e adattative nella lamina propria (Didriksen et al., 2024; Yao et al., 2024). A livello dell'immunità innata, il riconoscimento di componenti microbiche (ad es. lipopolisaccaride, flagellina, peptidoglicano) avviene attraverso recettori di riconoscimento del pattern (PRRs), tra cui Toll-like receptors (TLRs) e NOD-like receptors (NLRs), espressi da cellule epiteliali e cellule mieloidi residenti; l'attivazione controllata di tali vie non induce necessariamente infiammazione, ma può promuovere uno stato di tolleranza funzionale e di "allerta regolata", essenziale per garantire difesa contro i patogeni senza compromettere la convivenza con i commensali (Valentini et al., 2014; Yoo et al., 2020; Zheng et al., 2020). Parallelamente, la maturazione dell'immunità adattativa è modulata da taxa specifici e, soprattutto, dai metaboliti microbici: ad esempio gli acidi grassi a catena corta (SCFAs; acetato, propionato, butirato), prodotti dalla fermentazione delle fibre, influenzano la differenziazione e la funzione dei linfociti T (incluso l'equilibrio Th17/Treg), agendo tramite inibizione delle istone-deacetilasi (HDAC), segnalazione attraverso recettori accoppiati a proteine G e rimodellamento metabolico delle cellule immunitarie (Du et al., 2024; Pang et al., 2025; Saadh et al., 2025). Questo controllo immuno-metabolico risulta particolarmente rilevante anche in fasi sensibili dello sviluppo, poiché la disponibilità di substrati (dieta e latte umano) e la dinamica di colonizzazione possono modulare la produzione di SCFAs e, di conseguenza, le traiettorie di maturazione immunitaria (Bui et al., 2025). Il mantenimento dell'omeostasi microbiota-ospite dipende quindi da un equilibrio tra composizione microbica, integrità della barriera intestinale e regolazione delle risposte immunitarie; la barriera non è un muro statico, ma un'interfaccia attiva che controlla selettivamente il dialogo tra contenuti luminali e comparto immunitario, limitando l'esposizione ad antigeni e microrganismi e prevenendo l'infiammazione cronica (Neurath et al., 2025). Quando tale equilibrio si altera, si instaura una condizione di disbiosi, tipicamente caratterizzata da perdita di diversità, riduzione di microrganismi associati a funzioni benefiche (ad es. produttori di butirato) ed espansione di specie opportunistiche o pro-

infiammatorie; ciò può favorire un'iperattivazione delle vie innate, aumentare la permeabilità intestinale e promuovere la traslocazione microbica o di prodotti microbici (ad es. endotossine) con amplificazione della risposta infiammatoria e possibili effetti sistemici (Di Vincenzo et al., 2024; Charitos et al., 2025; Shen et al., 2025). In questo quadro, la modulazione mirata del microbiota è considerata una strategia promettente, ma richiede un approccio rigoroso e basato su evidenze scientifiche: l'impiego di probiotici e interventi combinati con substrati selettivi (prebiotici) deve essere supportato da dati clinici specifici per ceppo, dose e indicazione, mentre crescono l'interesse e la standardizzazione concettuale anche per "postbiotici" (preparazioni di microrganismi inattivati e/o loro componenti) come alternative potenzialmente più controllabili in termini di sicurezza e riproducibilità (Swanson et al., 2020; Salminen et al., 2021). Complessivamente, l'interazione microbiota-ospite appare come un sistema complesso, nel quale segnali microbici, barriera epiteliale e risposta immunitaria determinano la salute dell'ospite; la comprensione dei meccanismi molecolari che regolano tale dialogo sta guidando lo sviluppo di strategie preventive e terapeutiche di "microbiota-targeting", imponendo però la necessità di una caratterizzazione funzionale accurata (meccanicistica e clinica) degli interventi proposti (Jordan and Clarke, 2024; Neurath et al., 2025).

“*Lactic acid bacteria*”: caratteristiche biologiche e ruolo funzionale

Generalità e classificazione

I batteri lattici, o lactic acid bacteria (LAB) rappresentano un gruppo eterogeneo di microrganismi Gram-positivi caratterizzati dalla capacità di fermentare i carboidrati con produzione prevalente di acido lattico come principale prodotto finale del metabolismo fermentativo (Abedi and Hashemi, 2020; Anumudu et al., 2024). Dal punto di vista tassonomico, i LAB non costituiscono un'unità filogenetica ma includono generi appartenenti ai phyla Firmicutes e Actinobacteria, tra cui *Lactobacillus* (di recente riorganizzato in numerosi generi distinti sulla base di analisi filogenomiche e fenotipiche), *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, alcune specie di *Streptococcus* e *Enterococcus* (Xu et al., 2023; Zhao et al., 2024). Questi microrganismi sono caratterizzati da un metabolismo fermentativo obbligato o facoltativo, con una limitata capacità biosintetica per molte vie anaboliche essenziali, condizione che ha favorito l'evoluzione di adattamenti specifici a nicchie ecologiche ricche di nutrienti (Abedi and Hashemi, 2020; Anumudu et al., 2024). Tali caratteristiche ecologico-metaboliche spiegano l'ampia diffusione dei LAB in ambienti naturali e antropici, inclusi prodotti alimentari fermentati, superfici mucosali animali e il tratto gastrointestinale umano, dove essi possono instaurare relazioni complesse con l'ospite e con altre comunità microbiche contribuendo al mantenimento dell'equilibrio ecosistemico (Hill et al., 2014). Dal punto di vista metabolico, sono tradizionalmente distinti in omolattici ed eterolattici a seconda delle vie biochimiche impiegate per la fermentazione dei carboidrati: gli omolattici producono prevalentemente acido lattico a partire dal glucosio tramite la via del fosfochetolato, mentre gli eterolattici generano una miscela di prodotti fermentativi comprendente acido lattico, etanolo, anidride carbonica e altri acidi organici secondari (Zhao et al., 2024a). Questa diversità metabolica si traduce in una variabilità funzionale che risulta di particolare rilevanza sia in ambito tecnologico-alimentare, influenzando caratteristiche quali aroma e texture dei prodotti fermentati, sia in ambito biologico-ecologico, in virtù del ruolo di tali metaboliti nel modulare interazioni microbiche e risposte fisiologiche dell'ospite (Wang et al., 2021; Garg et al., 2024). Storicamente, l'interesse per i LAB è nato principalmente dal loro impiego nelle fermentazioni alimentari tradizionali, dove essi contribuiscono alla conservazione degli alimenti, allo sviluppo delle proprietà organolettiche e alla sicurezza microbiologica attraverso acidificazione e

competizione con patogeni (Hill et al., 2014). Negli ultimi decenni, tuttavia, l'attenzione scientifica si è notevolmente estesa includendo l'analisi del loro potenziale come probiotici e come modulatori delle funzioni fisiologiche dell'ospite, grazie anche all'impiego di approcci omici, modelli sperimentali avanzati e trial clinici volti a comprendere meccanismi d'azione e benefici associati a specifici ceppi (Markowiak and Śliżewska, 2017; Kiouisi et al., 2021; Idrees et al., 2022). Nel contesto del microbiota umano, essi sono considerati componenti rilevanti sebbene spesso minoritari rispetto ad altri taxa dominanti dell'intestino adulto; la loro presenza è comunque associata a interazioni con l'epitelio intestinale, la modulazione delle risposte immunitarie innate, la competizione con microrganismi opportunistici e il supporto all'integrità della barriera mucosale (Kiouisi et al., 2021; Idrees et al., 2022; Ma et al., 2024). È importante sottolineare che le proprietà funzionali attribuitegli non possono essere generalizzate a livello di specie o di genere, ma risultano fortemente dipendenti dalle caratteristiche genetiche e fisiologiche di singoli ceppi: varianti genomicamente simili possono mostrare differenze significative nella sopravvivenza in condizioni gastrointestinali, nella produzione di metaboliti bioattivi e nelle interazioni con il sistema immunitario dell'ospite (Hou et al., 2022b; Idrees et al., 2022; Zeng et al., 2025).

I batteri lattici e il loro utilizzo come probiotici: termini e requisiti funzionali

Il termine probiotico è comunemente impiegato per descrivere microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguata, conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite. Tale definizione è stata formalizzata e periodicamente aggiornata dalle organizzazioni internazionali quali Food and Agriculture Organization (FAO) e World Health Organization (WHO), che sottolineano come siano imprescindibili sia la vitalità del microrganismo al momento della somministrazione sia la dimostrazione sperimentale di un effetto benefico misurabile sull'ospite (Hill et al., 2014; Sanders et al., 2016, 2019). In questo contesto, i LAB costituiscono il gruppo microbico maggiormente studiato e impiegato come probiotico, oggetto di un'intensa attività di ricerca che ne ha esplorato sia i meccanismi d'azione sia le applicazioni cliniche e nutrizionali (Zielińska and Kolożyn-Krajewska, 2018). Per essere considerato probiotico, un ceppo deve soddisfare una serie di requisiti funzionali e di sicurezza ben definiti: innanzitutto la capacità di sopravvivere alle condizioni avverse del tratto gastrointestinale, quali il pH gastrico estremamente acido e la presenza di sali biliari detergenti, oltre all'assenza di fattori di virulenza e di resistenze agli antibiotici trasferibili, che potrebbero costituire un rischio per la salute pubblica (Sanders et al., 2019). Tuttavia, tali criteri, pur essendo indispensabili per l'idoneità tecnica di un probiotico, non sono sufficienti di per sé a definire il reale potenziale funzionale di un ceppo: è infatti necessario dimostrare effetti biologici benefici sull'ospite attraverso studi mirati e appropriati disegni sperimentali (Binda et al., 2020; Uhegwu and Anumudu, 2025). Negli ultimi anni si è chiaramente imposta l'idea che la valutazione dei probiotici non possa limitarsi a un approccio descrittivo o tecnologico, ma debba includere l'analisi degli effetti biologici esercitati sull'ospite. Tra questi, la capacità di modulare le risposte immunitarie innate e di influenzare l'equilibrio del microbiota residente rappresenta uno degli aspetti più rilevanti per la definizione funzionale di un probiotico (Zielińska and Kolożyn-Krajewska, 2018; Binda et al., 2020). In questo senso, i LAB non possono essere considerati semplicemente come microrganismi "benefici" in senso generico, ma piuttosto come agenti biologici in grado di interagire attivamente con l'ospite attraverso meccanismi che includono la competizione con patogeni, la produzione di metaboliti e la modulazione di percorsi immunitari (La Fata et al., 2018; Jordan and Clarke, 2024). Proprio quest'ultima è un elemento chiave, infatti studi recenti hanno confermato che specifici ceppi di LAB possono indurre risposte immunitarie differenti, che spaziano dall'attivazione controllata dell'immunità innata alla promozione di meccanismi di tolleranza immunologica, con effetti che si manifestano in termini di modulazione delle citochine, stimolazione delle cellule dendritiche e

influenza sull'equilibrio delle popolazioni di linfociti T (La Fata et al., 2018; Mazziotta et al., 2023). Tali effetti dipendono in larga misura dalle caratteristiche genetiche e strutturali del singolo ceppo, nonché dal contesto fisiologico dell'ospite e dalle modalità di somministrazione. La natura ceppo-specifica, già precedentemente accennata, rappresenta una delle principali sfide per i ricercatori. Ceppi appartenenti alla stessa specie possono infatti mostrare comportamenti biologici profondamente diversi, rendendo inadeguato l'utilizzo di criteri di selezione basati esclusivamente su classificazioni tassonomiche di alto livello (La Fata et al., 2018; Zielińska and Kolożyn-Krajewska, 2018; Jordan and Clarke, 2024).

Meccanismi di azione probiotica

Come precedentemente accennato, gli effetti benefici attribuiti ai LAB non derivano da un singolo meccanismo d'azione, ma emergono da un insieme integrato di processi biologici che coinvolgono interazioni dirette e indirette con l'ospite e con le altre componenti del microbiota (Plaza-Diaz et al., 2019). Tra i principali meccanismi probiotici attribuiti ai LAB si annoverano l'immunomodulazione, l'antagonismo nei confronti di microrganismi potenzialmente patogeni, la capacità di aderire alle superfici biologiche e di interagire con i biofilm microbici. Tali processi non operano separatamente, ma spesso agiscono in modo sinergico contribuendo al mantenimento dell'omeostasi dell'ospite (Bermudez-Brito et al., 2012; Plaza-Diaz et al., 2019).

Immunomodulazione

Un meccanismo centrale riguarda la modulazione trascrizionale e funzionale della risposta immunitaria dell'ospite. I LAB possono interagire con il sistema immunitario mucosale attraverso il riconoscimento di componenti microbiche da parte di recettori dell'immunità innata, quali TLR e NOD-like receptors, presenti sulla superficie delle cellule epiteliali e delle cellule immunitarie della lamina propria. Tale riconoscimento può spingere verso una risposta immunitaria bilanciata, favorendo la produzione di citochine anti-infiammatorie e la stimolazione di cellule regolatorie come i linfociti T reg, contribuendo così alla tolleranza immunologica e alla protezione contro stati infiammatori e stress mucosale (Bermudez-Brito et al., 2012; Mazziotta et al., 2023). Il dialogo tra ceppi probiotici e cellule immunitarie può inoltre migliorare la funzione del tessuto linfoide associato all'intestino (GALT), favorendo la produzione di IgA secretorie e la sorveglianza immunitaria contro antigeni patogeni senza scatenare risposte infiammatorie dannose (Mazziotta et al., 2023).

Antagonismo microbico

Un secondo meccanismo probiotico fondamentale è l'antagonismo microbico, che si manifesta attraverso diverse strategie. I LAB possono competere con i patogeni per i siti di adesione sulle mucose e per i nutrienti disponibili, limitando così la capacità dei microrganismi avversi di colonizzare il tratto gastrointestinale. Inoltre, i LAB producono metaboliti con attività antimicrobica quali acido lattico e altri acidi organici che abbassano il pH locale, creando condizioni sfavorevoli alla crescita di numerosi patogeni; la produzione di batteriocine e altre sostanze antimicrobiche può inibire selettivamente agenti patogeni, contribuendo alla stabilità

dell'ecosistema microbico e riducendo il rischio di disbiosi (Bermudez-Brito et al., 2012; Hemarajata and Versalovic, 2013; Plaza-Diaz et al., 2019).

Metaboliti con attività antimicrobica

I LAB esercitano una parte rilevante della loro azione probiotica attraverso la produzione di metaboliti e molecole secrete o rilasciate in ambiente intestinale, capaci di modificare in modo diretto le condizioni ecologiche locali, modulare le interazioni microbo-microbo e influenzare la fisiologia dell'ospite. In tale prospettiva, l'effetto "benefico" non è necessariamente legato alla colonizzazione stabile, ma può dipendere dalla persistenza dei prodotti metabolici (Tang et al., 2017). Tra i metaboliti più caratteristici rientrano gli acidi organici, in particolare l'acido lattico, che contribuisce all'abbassamento del pH e alla creazione di condizioni sfavorevoli alla crescita di numerosi patogeni; questo effetto ambientale, oltre a ridurre la fitness di microrganismi opportunisti, può favorire indirettamente la stabilità di comunità commensali acido-tolleranti, contribuendo al mantenimento di un ecosistema più resiliente (Tang et al., 2017, 2023). Un punto spesso sottovalutato è che il lattato prodotto da LAB (e da altri fermentatori) può anche entrare in reti di cross-feeding: in specifiche condizioni ecologiche, il lattato rappresenta un substrato utilizzabile da batteri secondari capaci di convertirlo in metaboliti come il butirrato, con potenziali ricadute sulla funzione di barriera e sulla regolazione immunitaria; tali circuiti di cooperazione metabolica sono altamente dipendenti dal contesto (dieta, comunità microbica preesistente) e dalla combinazione di ceppi presenti (Xiao et al., 2024; Zhao et al., 2024a). Accanto agli acidi organici, numerosi LAB producono batteriocine e peptidi antimicrobici a spettro variabile, con attività che può includere l'inibizione selettiva di patogeni e la modulazione competitiva di comunità microbiche; la letteratura recente evidenzia sia l'interesse applicativo (bioconservazione) sia la crescente attenzione verso possibili implicazioni nella prevenzione o nel supporto a condizioni intestinali associate a disbiosi, pur richiedendo ancora una chiara definizione ceppo-prodotto-dose-target in contesti clinici (Chen et al., 2025; Liang et al., 2025). Un ulteriore gruppo di molecole di grande rilievo è rappresentato dagli esopolisaccaridi (EPS) prodotti dai LAB, i quali possono contribuire alla tolleranza allo stress, alla persistenza e alle interazioni con superfici mucosali; sul versante dell'ospite, gli EPS sono stati descritti come molecole capaci di influenzare la risposta immunitaria e la funzione intestinale, con effetti riportati su barriere epiteliali, stress ossidativo e comunicazione immunitaria, sebbene l'eterogeneità strutturale degli EPS renda necessario un approccio rigorosamente ceppo e molecola-specifico (Yang et al., 2023; Liang et al., 2024; Liu

et al., 2025). In questo quadro, i metaboliti dei LAB possono essere letti come una “interfaccia chimica” tra microbiota e ospite: non solo prodotti finali del metabolismo, ma segnali ecologici e immuno-modulatori che contribuiscono a spiegare perché l’attività probiotica non sia generalizzabile per genere o specie, e richieda invece una caratterizzazione funzionale puntuale del singolo ceppo e del suo profilo metabolico (Tang et al., 2023). L’interesse crescente per i prodotti microbici ha inoltre consolidato il tema dei postbiotici, concetto distinto dai probiotici: Secondo il consenso ISAPP, un postbiotico è una preparazione di microrganismi inanimati e/o loro componenti che conferisce un beneficio alla salute dell’ospite; la definizione include potenzialmente componenti cellulari con o senza metaboliti, ma esclude i metaboliti microbici purificati considerati da soli (Salminen et al., 2021; Vinderola et al., 2022). Ulteriori chiarimenti ISAPP hanno rimarcato la necessità di evitare definizioni troppo “metabolite-centriche” e di mantenere criteri che permettano valutazioni sperimentali riproducibili e claims basati su evidenza (Swanson et al., 2020; Vinderola et al., 2022). Complessivamente, l’analisi dei metaboliti dei LAB, acidi organici e reti di cross-feeding, batteriocine, EPS e altri effettori secreti, rappresenta un passaggio chiave per collegare le proprietà genomiche e fenotipiche dei ceppi ad outcome biologici.

Interazione con superfici biologiche e biofilm

La capacità di aderire alle superfici biologiche rappresenta un altro elemento chiave dell’attività probiotica. Ad esempio, l’adesione dei LAB all’epitelio intestinale o alla mucosa mucinica consente loro di persistere per periodi prolungati nell’ambiente intestinale, incrementando la loro efficacia funzionale. Questo processo è mediato da molecole di superficie batterica, tra cui proteine adesive e domini di legame alla mucina, che facilitano l’interazione con componenti dell’ospite. Tale adesione non solo favorisce la persistenza nel tratto gastrointestinale ma può anche ostacolare la colonizzazione dei patogeni per esclusione competitiva (Bermudez-Brito et al., 2012; Mazziotta et al., 2023). Infine, alcuni ceppi di LAB mostrano capacità di interagire con biofilm microbici, influenzandone la formazione e la stabilità. La formazione di biofilm da parte di batteri probiotici può creare microambienti che favoriscono la resistenza allo stress e la protezione contro patogeni, oltre a facilitare la co-esistenza con il microbiota residente. In altri casi, i LAB possono interferire con i biofilm patogeni riducendo la loro maturazione o stabilità, contribuendo così a ridurre la persistenza di comunità microbiche dannose (Yao et al., 2024).

Vescicole extracellulari batteriche: panoramica e attività biologica

Negli ultimi anni la ricerca microbiologica ha spostato l'attenzione sullo studio delle vescicole extracellulari batteriche (BEVs) come nuove entità biologiche coinvolte nella comunicazione microbo-microbo e microbo-ospite. Le BEVs sono strutture nanoscalari rilasciate attivamente sia da batteri Gram-negativi sia da batteri Gram-positivi e sono oggi riconosciute come mediatori centrali di interazioni biologiche complesse, superando la visione tradizionale del batterio come unità cellulare isolata e suggerendo un ruolo dinamico nella trasmissione di segnali biochimici e molecolari (Ñahui Palomino et al., 2021; Melo-Marques et al., 2024). Dal punto di vista strutturale, sono particelle delimitate da una membrana lipidica con dimensioni tipicamente comprese tra circa 20 e 400 nanometri, contenenti una varietà di componenti biologici tra cui proteine, lipidi, acidi nucleici e metaboliti; la composizione di queste vescicole non è casuale ma riflette processi di cargo sorting selettivo che conferiscono alle BEVs una funzione biologica definita e specifica (Liang et al., 2024; Liu et al., 2025). Sebbene le BEVs siano state inizialmente descritte nei Gram-negativi, in particolare come outer membrane vesicles (OMVs) che si originano dalla membrana esterna, è ormai ampiamente documentato che anche i batteri Gram-positivi, nonostante la presenza di uno spesso strato di peptidoglicano, possono produrre e rilasciare BEVs. La produzione nei Gram-positivi è sostenuta da meccanismi di biogenesi che coinvolgono modelli di blebbing della membrana citoplasmatica o processi di lisi controllata (Schwechheimer and Kuehn, 2015; Briaud and Carroll, 2020; Muñoz-Echeverri et al., 2024). Dal punto di vista funzionale, esse svolgono un ruolo chiave nel trasporto e nella protezione di molecole biologicamente attive. Incapsulando il loro contenuto all'interno di una struttura membranosa stabile, le BEVs consentono il rilascio mirato di segnali microbici, proteggendo tali molecole dalla degradazione ambientale e facilitandone l'interazione con le cellule bersaglio sia microbiche sia di altri organismi (Briaud and Carroll, 2020). Infatti, possono attraversare barriere biologiche e modulare risposte cellulari anche a distanza, rendendo possibili forme di comunicazione a lunga distanza tra microbi e tessuti. Uno degli aspetti più studiati riguarda il coinvolgimento delle BEVs nell'immunità innata. Le vescicole possono veicolare molecole immunoattive come lipoproteine, peptidoglicani, proteine di superficie e frammenti di acidi nucleici che sono riconosciuti da recettori dell'immunità innata. L'interazione tra questi ligandi BEV-associati e recettori quali TLR può modulare le vie di segnalazione immunitaria, esercitando effetti pro o anti-infiammatori a seconda del contesto biologico (Kozakiewicz et al., 2025). Diverse evidenze indicano che BEVs derivati da ceppi probiotici possono indurre risposte immunomodulatorie, influenzando la

produzione di citochine, la funzione delle cellule dendritiche e la regolazione delle barriere epiteliali, suggerendo meccanismi di azione che non richiedono la presenza della cellula batterica viva (Domínguez Rubio et al., 2022; Kozakiewicz et al., 2025). Nel caso specifico dei LAB, l'interesse è particolarmente elevato perché esse rappresentano un possibile meccanismo attraverso cui i LAB esercitano effetti biologici indipendentemente dalla loro vitalità. Questo aspetto è rilevante nel contesto probiotico in quanto, come già accennato precedentemente, queste vescicole possono veicolare componenti molecolari e proteine immunomodulatorie con potenziale impatto sull'omeostasi dell'ospite, sulla regolazione della risposta infiammatoria e sulla funzione delle giunzioni strette epiteliali, contribuendo al mantenimento dell'integrità tissutale e alla modulazione delle risposte immunitarie senza gli stessi rischi associati alla somministrazione di batteri vivi (Kozakiewicz et al., 2025; Liu et al., 2025). Risultati sperimentali recenti mostrano, per esempio, che vescicole prodotte da ceppi di *Lactobacillus gasseri* possono attenuare risposte infiammatorie attraverso la modulazione della via TLR4/NF- κ B in modelli cellulari (Koh et al., 2025). Un ulteriore elemento di interesse è costituito dalla possibilità che le BEVs contribuiscano all'antagonismo microbico e alle interazioni con biofilm. Le BEVs possono veicolare enzimi, peptidi antimicrobici o molecole che influenzano la crescita e l'organizzazione di altre comunità microbiche, partecipando alla modulazione degli ecosistemi microbici e potenzialmente favorendo la stabilità di comunità commensali o limitando la proliferazione di specie dannose (Domínguez Rubio et al., 2022). In questo senso, esse ampliano il repertorio funzionale dei LAB oltre l'azione diretta delle cellule batteriche, offrendo un ulteriore livello di interazione microbica e microbo-ospite.

Modelli sperimentali preclinici nel contesto regolatorio: approcci alternativi per lo screening funzionale dei probiotici

Un modello sperimentale può essere definito come una rappresentazione semplificata di un sistema biologico complesso, progettata per riprodurre specifici aspetti fisiologici o patologici dell'organismo bersaglio. Nell'ambito della ricerca biomedica e microbiologica, i modelli preclinici svolgono un ruolo fondamentale nel colmare il divario conoscitivo tra gli studi *in vitro* e l'applicazione clinica, consentendo di valutare l'efficacia, la sicurezza e i meccanismi d'azione di agenti biologici, molecole farmacologiche o microrganismi in un contesto biologico integrato (van der Worp et al., 2010; Perrin, 2014).

Modelli *in vitro*: utilità e limiti

Lo studio dei microrganismi si è storicamente basato su un'ampia gamma di approcci *in vitro* per valutare la resistenza a condizioni gastrointestinali simulate, l'attività antimicrobica, la capacità di adesione a linee cellulari epiteliali e la produzione di metaboliti bioattivi. Questi modelli rappresentano strumenti fondamentali nelle prime fasi di studio grazie alla loro semplicità, economicità e riproducibilità (Anjum et al., 2022; Sim et al., 2025). Tuttavia, tali approcci mostrano limiti intrinseci che ne condizionano il valore predittivo per gli effetti biologici *in vivo*. Un limite rilevante è l'incapacità di riprodurre interazioni dinamiche multilivello tra microbi, cellule ospiti e segnali fisiologici: la maggior parte dei sistemi *in vitro* non consente co-culture di lunga durata tra cellule umane e consorzi microbici complessi, rendendo difficile studiare fenomeni di interdipendenza metabolica o di competizione tra microrganismi in un ambiente fisiologico (Torrey et al., 2020; Song et al., 2021). Inoltre, molti modelli semplificano eccessivamente condizioni quali gradienti di ossigeno, flusso di nutrienti e motilità intestinale, fattori chiave che influenzano la fisiologia microbica ma non sono facilmente replicabili in colture statiche o in biofilm monostrain (Torrey et al., 2020; Song et al., 2021; Sim et al., 2025). Un'ulteriore criticità riguarda l'assenza di risposte immunitarie integrate: i sistemi *in vitro* non sono in grado di simulare in modo affidabile l'integrazione tra componenti del sistema immunitario e microbiota né di ricreare segnali endocrini e nervosi che modulano la fisiologia dell'ospite. Questo aspetto è particolarmente rilevante nella valutazione dei probiotici, i cui effetti dipendono spesso dalla modulazione di percorsi immunitari o

dall'integrità della barriera mucosale, fenomeni che richiedono una rete di comunicazione cellulare e umorale non riproducibile in sistemi statici (Torrey et al., 2020; Song et al., 2021; Sim et al., 2025). Le limitazioni metodologiche emergono anche nella simulazione di comunità microbiche complesse: la maggior parte dei modelli *in vitro* lavora con poche specie, mentre *in vivo* la diversità e le interazioni intermicrobiche influenzano in modo sostanziale le risposte metaboliche e immunitarie. Modelli più avanzati, come piattaforme organ-on-a-chip e colture 3D dell'epitelio con co-colture cellulari, hanno cercato di superare parte di queste limitazioni; tuttavia, anche tali approcci incontrano difficoltà nel simulare risposte sistemiche reali o adattative di lungo periodo e richiedono ulteriore sviluppo tecnologico e standardizzazione per essere pienamente predittivi (Torrey et al., 2020; Song et al., 2021). Nel caso in oggetto, cioè lo studio dei LAB, questi limiti risultano particolarmente evidenti: molte proprietà funzionali attribuite loro, come la modulazione delle risposte immunitarie innate o l'interazione con sistemi endocrini o neurali, emergono pienamente solo in presenza di un ospite vivente e non possono essere adeguatamente riprodotte *in vitro* (Hill et al., 2014; Cutuli et al., 2019). Pertanto, sebbene gli approcci *in vitro* siano indispensabili per investigare meccanismi specifici, non risultano sufficienti per una valutazione funzionale completa.

Modelli animali vertebrati: valore informativo e vincoli di traslabilità e scalabilità

Tra i modelli vertebrati *in vivo*, quelli che appartengono alla famiglia dei roditori (coniglio, cavia, ratti e topi) sono storicamente considerati il gold standard della sperimentazione preclinica grazie a importanti similitudini anatomiche o fisiologiche o immunologiche con l'umano. L'adozioni di questi modelli ha fornito informazioni cruciali sull'eziopatogenesi delle malattie, sulla risposta immunitaria e sulla farmacocinetica e tossicità di numerosi composti (Hooijmans and Ritskes-Hoitinga, 2013). In ambito probiotico, i modelli murini consentono di analizzare in modo dettagliato l'impatto dei microrganismi sull'ospite in termini immunologici, metabolici e fisiologici, permettendo la valutazione di risposte sistemiche complesse e di effetti a lungo termine (Hooijmans and Ritskes-Hoitinga, 2013; Perrin, 2014). Tale approccio ha contribuito in maniera sostanziale alla comprensione delle interazioni microbiota-ospite, fornendo informazioni sui meccanismi di immunomodulazione, sull'omeostasi intestinale, sulla regolazione metabolica e sul transito gastrointestinale (Lynch and Pedersen, 2016; Sanders et al., 2019). Nonostante queste potenzialità, la complessità biologica dei modelli vertebrati non sempre garantisce una completa traslabilità dei risultati all'uomo, come evidenziato dall'elevato tasso di fallimento di candidati farmacologici nelle fasi cliniche avanzate (van der Worp et al., 2010; Perrin, 2014). A ciò si aggiungono limiti pratici ed economici poiché la valutazione funzionale di un elevato numero di ceppi è difficilmente compatibile con costi, tempi e limitazioni etiche legate all'uso di molti esemplari (Pound and Ritskes-Hoitinga, 2018). Queste considerazioni rendono evidente la necessità di affiancare ai modelli vertebrati sistemi sperimentali alternativi in grado di fornire informazioni biologicamente solie e rilevanti nelle fasi iniziali della ricerca, ottimizzando la pipeline di selezione e riducendo l'impiego di animali (Pound and Ritskes-Hoitinga, 2018; Cutuli et al., 2019; Serrano et al., 2023).

Contesto regolatorio e principio delle 3R: implicazioni operative per la ricerca preclinica

L'impiego di animali nella ricerca scientifica in Europa è disciplinato dalla Direttiva 2010/63/UE e ss. mm. ii. del Parlamento europeo e del Consiglio sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, adottata nel 2010 e recepita dagli Stati membri. La Direttiva mira ad armonizzare le legislazioni nazionali, garantire elevati standard di benessere animale e promuovere lo sviluppo e l'adozione di metodi alternativi scientificamente validi per ridurre l'uso di animali nei test. Un elemento centrale è l'integrazione strutturale del principio delle tre R (Replacement, Reduction, Refinement), introdotto da Russell e Burch nel 1959 e riconosciuto come fondamento etico e metodologico della sperimentazione *in vivo*. Il principio impone la sostituzione totale o parziale dell'uso di animali vertebrati con metodi alternativi, la riduzione del numero di animali mantenendo robustezza statistica e il raffinamento delle procedure per minimizzare dolore, sofferenza e stress. La Direttiva 2010/63/UE si applica a tutti gli animali vertebrati non umani vivi, incluse forme larvali indipendenti dall'alimentazione e i cefalopodi, mentre la maggior parte degli invertebrati, come gli insetti, resta esclusa dalla tutela legislativa e non richiede la medesima autorizzazione formale in ambito sperimentale. Per l'impiego di vertebrati è necessaria un'autorizzazione preventiva da parte delle autorità competenti, fondata su un'analisi dettagliata del razionale scientifico, dell'assenza di metodi alternativi validi e del rapporto tra danno atteso e beneficio scientifico, come nella valutazione harm-benefit prevista dal quadro europeo. In Italia la Direttiva è stata attuata con il Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, che definisce procedure autorizzative, controlli e responsabilità per i progetti che prevedono l'uso di animali vertebrati; in tale quadro il ricorso a modelli animali è consentito solo in assenza di alternative scientificamente adeguate e privilegiando procedure che minimizzino il numero di animali e lo stress. Pur essendo essenziali, questi vincoli comportano complessità burocratiche, costi e tempi che risultano particolarmente gravosi per studi esplorativi e screening, incentivando l'uso di modelli alternativi basati su invertebrati come strumenti di replacement e reduction nelle fasi iniziali. Coerentemente, l'evoluzione delle politiche europee promuove la progressiva riduzione dell'impiego di vertebrati attraverso il rafforzamento delle New Approach Methodologies (NAMs), comprendenti metodi *in vitro*, modelli computazionali e altri approcci alternativi, considerati parte integrante della visione futura della sperimentazione responsabile (Maestri, 2021; Calvillo, 2022; Kousholt et al., 2023; Lauwereyns et al., 2024).

Modelli invertebrati e razionale d'uso nello screening funzionale

Tra i modelli animali alternativi, le larve di invertebrati quali *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* sono state ampiamente utilizzate per lo studio delle interazioni ospite-patogeno e grazie alla presenza di risposte immunitarie innate conservate e alla facilità di manipolazione sperimentale (Tsai et al., 2016; Vidal et al., 2024). Negli ultimi anni i modelli invertebrati hanno assunto un ruolo crescente per l'analisi di meccanismi di virulenza, risposte immunitarie innate e attività antimicrobiche in un contesto *in vivo* semplificato, mostrando una buona correlazione con osservazioni ottenute in modelli vertebrati (Tsai et al., 2016; Serrano et al., 2023). Questi organismi offrono vantaggi sperimentali rilevanti, tra cui facilità di manipolazione, costi contenuti e rapidità di esecuzione, risultando adatti a studi esplorativi e screening ad alto rendimento (Cutuli et al., 2019; Pereira et al., 2020; Serrano et al., 2023). Inoltre, la conservazione evolutiva di pathway dell'immunità innata, inclusi Toll, IMD e JAK/STAT, consente di ottenere informazioni biologicamente significative sui processi di riconoscimento e risposta agli stimoli microbici (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018; Petronio Petronio et al., 2022). L'idoneità dei diversi modelli è tuttavia condizionata da vincoli biologici: in *C. elegans* e *D. melanogaster*, le dimensioni estremamente ridotte e le condizioni di allevamento possono limitare la somministrazione controllata di microrganismi o molecole e la raccolta di campioni per analisi cellulari e molecolari approfondite (Tsai et al., 2016; Pereira et al., 2020). In questo contesto, *G. mellonella* presenta vantaggi specifici grazie alle dimensioni maggiori delle larve e ad altre caratteristiche anatomicofisiologiche (Cutuli et al., 2019; Serrano et al., 2023). Infatti, come vedremo nei prossimi capitoli, l'impiego di *G. mellonella* nello studio dei LAB rappresenta una scelta metodologica razionale e coerente con i principi delle 3R, poiché consente di ridurre significativamente l'utilizzo di modelli vertebrati e costituisce il fondamento sperimentale della presente tesi.

Galleria mellonella

Caratteristiche biologiche e ciclo vitale

G. mellonella, comunemente nota come tarma maggiore della cera, è un insetto appartenente al phylum Arthropoda, classe Insecta, ordine Lepidoptera e famiglia Pyralidae, ampiamente diffuso e noto storicamente come infestante degli alveari di *Apis mellifera*, dove le larve si nutrono di cera, polline e residui organici. Sebbene inizialmente è stata studiata in ambito entomologico, negli ultimi decenni questa specie ha acquisito crescente rilevanza come modello sperimentale alternativo per studi microbiologici, immunologici e di virulenza microbica *in vivo*, grazie alle sue caratteristiche biologiche uniche (Cutuli et al., 2019; Serrano et al., 2023). Il ciclo vitale di *G. mellonella* comprende quattro principali stadi: uovo, larva, pupa e adulto. Le uova schiudono in larve che attraversano numerosi stadi di crescita nel corso di circa cinque-sei settimane prima di entrare nella fase di prepupa e successivamente di pupa, da cui origina l'adulto (Wojda, 2017). Nella ricerca sperimentale, lo stadio larvale avanzato (di solito l'ultimo instar) è preferito per studi *in vivo*, poiché raggiunge dimensioni adeguate (circa 2-3 cm di lunghezza e peso di alcune centinaia di milligrammi) e possiede un sistema immunitario innato pienamente funzionante, rendendo possibili inoculi precisi di microrganismi o composti bioattivi e raccolta di emolinfa e tessuti per analisi biologiche (Wojda, 2017; Cutuli et al., 2019; Serrano et al., 2023). Dal punto di vista sperimentale, le larve presentano vantaggi pratici significativi: la loro relativa grandezza facilita la manipolazione manuale, l'inoculazione di agenti e la raccolta di campioni biologici, mentre le possibilità di mantenimento in laboratorio non richiedono condizioni ambientali complesse o costose. Un altro elemento che distingue *G. mellonella* da molti altri modelli invertebrati, come *C. elegans* o *D. melanogaster*, è la capacità di sopravvivere e crescere a temperature prossime a quelle fisiologiche umane, fino a 37 °C, rendendo possibile lo studio di fattori che dipendono dalla temperatura (Serrano et al., 2023). A differenza dei vertebrati, *G. mellonella* non possiede un sistema immunitario adattativo basato su linfociti con memoria immunologica e produzione di anticorpi, ma il suo sistema immunitario innato comprende meccanismi cellulari e umorali coinvolti nella fagocitosi, nella melanizzazione e nella produzione di peptidi antimicrobici, che presentano sorprendenti omologie funzionali con componenti dell'immunità innata dei mammiferi, con significative implicazioni per la traslazione di risultati da modelli invertebrati a contesti biomedici (Cutuli et al., 2019; Serrano et al., 2023). Tale risposta immunitaria innata può essere quantificata attraverso vari readout, inclusi la densità di emociti circolanti, attività melanizzante e

produzione di peptidi antimicrobici, fornendo misure sperimentali utili per confronti interspecifici di virulenza e immunomodulazione (Tsai et al., 2016; Wojda, 2017; Cutuli et al., 2019; Serrano et al., 2023). Queste caratteristiche rendono *G. mellonella* un modello flessibile, riproducibile e compatibile con studi di screening preliminare, soprattutto quando è necessario testare numerose condizioni sperimentali differenti. Dal punto di vista pratico, questa larva può essere allevata con costi contenuti, non richiede attrezzature sofisticate e può essere gestita su larga scala. Queste peculiarità fisiologiche e immunologiche giustificano l'interesse crescente verso questo organismo come modello preclinico alternativo in grado di coniugare semplicità biologica, rilevanza traslazionale e rispetto dei principi etici alla base della sperimentazione moderna, in linea con le esigenze di studi microbiologici e immunologici contemporanei (Cutuli et al., 2019; Serrano et al., 2023).

Barriere fisiche e difesa basale

La prima linea di difesa di *G. mellonella* nei confronti degli agenti microbici è costituita da un insieme integrato di barriere fisiche e biochimiche che svolgono una funzione analoga a quella esercitata dalla cute e dalle superfici mucosali nei vertebrati. Tali meccanismi di difesa basale rappresentano un elemento fondamentale dell'immunità innata e contribuiscono in modo determinante alla resistenza dell'ospite contro la colonizzazione e l'invasione microbica (Wojda, 2017; Serrano et al., 2023). La cuticola costituisce la principale barriera esterna dell'insetto ed è composta prevalentemente da chitina, proteine strutturali e lipidi, garantendo una protezione meccanica efficace contro l'ingresso diretto dei patogeni e concorrendo al mantenimento dell'integrità fisiologica dell'organismo (Wojda, 2017). In seguito a lesioni della cuticola, che possono verificarsi sia in condizioni naturali sia durante procedure sperimentali, *G. mellonella* è in grado di attivare rapidamente meccanismi di riparazione della ferita basati sulla coagulazione dell'emolinfa. Questo sistema di coagulazione, pur essendo strutturalmente più semplice rispetto a quello dei vertebrati, presenta importanti analogie funzionali e molecolari, tra cui il coinvolgimento di transglutaminasi omologhe al fattore XIIIa umano, responsabili della stabilizzazione del coagulo e della formazione di una matrice protettiva attorno al sito di lesione (Altincicek et al., 2008; Wojda, 2017). Oltre alla barriera cuticolare, il tratto gastrointestinale svolge un ruolo cruciale nella difesa basale. L'intestino è rivestito da uno strato peritrofico ricco di chitina che separa il contenuto luminale dai tessuti sottostanti, limitando il contatto diretto con i microrganismi ingeriti e riducendo il rischio di traslocazione batterica (Cutuli et al., 2019; Serrano et al., 2023). A questo si associano condizioni biochimiche sfavorevoli alla colonizzazione patogena, quali il pH, la presenza di enzimi digestivi e l'attività competitiva del microbiota residente, che contribuiscono a creare un ambiente selettivo ostile alla proliferazione di microrganismi potenzialmente dannosi (Mukherjee et al., 2010). Il tratto intestinale rappresenta inoltre un importante sito di interazione tra microrganismi e sistema immunitario innato. Le cellule epiteliali intestinali condividono diverse caratteristiche funzionali con quelle dei vertebrati, tra cui la capacità di riconoscere segnali microbici attraverso recettori conservati e di contribuire all'attivazione di risposte immunitarie locali, come l'induzione di peptidi antimicrobici e la regolazione dei processi infiammatori (Wojda, 2017; Serrano et al., 2023). Questo aspetto risulta particolarmente rilevante nello studio delle interazioni ospite-microbo e nella valutazione di microrganismi somministrati per via orale. Nel loro insieme, le barriere fisiche e chimiche di *G. mellonella* non rappresentano strutture passive, ma componenti dinamiche del sistema immunitario innato

in grado di interagire con le risposte cellulari e umorali successive. Il superamento di queste barriere da parte dei microrganismi costituisce infatti il segnale iniziale che innesca l'attivazione delle difese immunitarie sistemiche, rendendo l'integrità e la funzionalità di tali barriere un determinante critico dell'esito dell'interazione ospite-microbo (Altincicek et al., 2008; Mukherjee et al., 2010).

Risposta immunitaria cellulare: emociti e funzioni effettrici

La risposta immunitaria cellulare rappresenta il principale meccanismo di difesa sistemica una volta superate le barriere fisiche ed è mediata da cellule specializzate denominate emociti, che circolano nell'emolinfa e svolgono funzioni analoghe a quelle delle cellule dell'immunità innata dei vertebrati (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018). Negli insetti, gli emociti comprendono differenti sottotipi cellulari distinti per caratteristiche morfologiche e funzionali e, in *G. mellonella*, sono stati descritti prevalentemente proemociti, plasmaticiti, granulociti e sferulociti (Wojda, 2017). Tra questi, plasmaticiti e granulociti rivestono un ruolo centrale nelle risposte effettrici contro i microrganismi, partecipando direttamente ai processi di fagocitosi, nodulazione e incapsulamento (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018). La fagocitosi costituisce il meccanismo di difesa cellulare più immediato e consiste nell'ingestione e degradazione dei patogeni da parte degli emociti. Questo processo è mediato dal riconoscimento di strutture microbiche conservate, i cosiddetti pathogen-associated molecular patterns (PAMP), da parte di recettori di riconoscimento dell'ospite, che innescano l'internalizzazione del microrganismo in compartimenti intracellulari seguita dalla sua distruzione mediante meccanismi enzimatici e ossidativi (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018). La fagocitosi presenta analogie funzionali rilevanti con quella osservata nei neutrofili e nei macrofagi dei vertebrati, confermando la conservazione evolutiva di questo meccanismo di difesa (Sheehan et al., 2018). In presenza di carichi microbici elevati o di patogeni di dimensioni non fagocitabili, gli emociti attivano risposte più complesse quali la nodulazione e l'incapsulamento, che portano alla formazione di aggregati cellulari attorno al patogeno e alla sua immobilizzazione, spesso in associazione con l'attivazione della cascata della melanizzazione (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018). Questi meccanismi consentono di contenere la diffusione sistemica dell'infezione e rappresentano una componente essenziale della risposta immunitaria degli insetti. Un elemento chiave della risposta cellulare è inoltre la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), generate in seguito all'attivazione di sistemi enzimatici funzionalmente analoghi alla NADPH ossidasi dei vertebrati. Il cosiddetto respiratory burst contribuisce in modo significativo all'attività microbica degli emociti e svolge un ruolo determinante nel controllo dell'infezione, richiedendo tuttavia una regolazione fine per prevenire danni collaterali ai tessuti dell'ospite (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018). Nel loro insieme, le funzioni degli emociti non si limitano a un'azione puramente effettrice, ma concorrono all'orchestrazione complessiva della risposta immunitaria innata attraverso l'interazione con i fattori umorali e l'attivazione di vie di segnalazione conservate tra insetti e vertebrati.

Risposta immunitaria umorale: peptidi antimicrobici e melanizzazione

La risposta immunitaria umorale rappresenta una componente fondamentale dell'immunità innata e agisce in stretta integrazione con i meccanismi cellulari. Essa è mediata da molecole solubili presenti nell'emolinfa, tra cui peptidi antimicrobici, enzimi litici e fattori coinvolti nella cascata della melanizzazione, che contribuiscono in modo diretto al controllo e all'eliminazione dei microrganismi (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018). Tra i principali effettori umorali si annoverano i peptidi antimicrobici, piccole molecole cationiche prodotte in risposta al riconoscimento di stimoli microbici. In *G. mellonella* è stato descritto un repertorio ampio di tali molecole, comprendente *gallerimycin*, *galiomycin*, *defensine*, *cecropine* e *moricine*, dotate di spiccata attività antibatterica e antifungina (Altincicek et al., 2008; Wojda, 2017). Questi peptidi esercitano la loro azione principalmente attraverso l'interazione con le membrane microbiche, inducendo alterazioni strutturali che portano alla permeabilizzazione e alla lisi cellulare, ma possono anche interferire con processi intracellulari essenziali per la sopravvivenza del patogeno (Sheehan et al., 2018). La sintesi dei peptidi antimicrobici è regolata dall'attivazione di vie di segnalazione immunitaria conservate, in particolare le vie Toll e IMD, che presentano analogie funzionali con i circuiti dell'immunità innata dei vertebrati. Il riconoscimento di componenti microbici attiva fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia NF- κ B, i quali controllano l'espressione dei geni codificanti i peptidi antimicrobici, consentendo una risposta rapida e modulabile in funzione dell'intensità e della natura dello stimolo (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018). Un ulteriore elemento cardine della risposta umorale è rappresentato dalla cascata della fenolossidasi, responsabile del processo di melanizzazione. In seguito a infezione o a danno tissutale, la pro-fenolossidasi viene attivata in fenolossidasi, catalizzando una serie di reazioni che portano alla sintesi di melanina e alla produzione di intermedi reattivi con attività antimicrobica. La melanizzazione contribuisce sia all'incapsulamento e all'immobilizzazione dei patogeni sia alla loro inattivazione chimica, ed è spesso osservabile macroscopicamente come un imbrunimento progressivo delle larve, utilizzato come indicatore visibile dell'attivazione immunitaria (Altincicek et al., 2008; Wojda, 2017). La risposta umorale non opera in modo isolato, ma è strettamente coordinata con quella cellulare. Gli emociti, oltre a svolgere funzioni fagocitiche, partecipano alla produzione e al rilascio di fattori umorali e contribuiscono all'attivazione della cascata della melanizzazione, consentendo una risposta integrata ed efficace contro i microrganismi (Sheehan et al., 2018). Un aspetto di particolare interesse è la possibilità che tale risposta venga modulata da microrganismi non patogeni o potenzialmente benefici. È stato infatti dimostrato che

l'esposizione a specifici batteri può indurre un'attivazione delle vie immunitarie innate, senza provocare effetti deleteri per l'ospite (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018).

Vie di segnalazione immunitaria conservate

L'attivazione coordinata delle risposte immunitarie cellulari e umorali in *G. mellonella* è regolata da un insieme di vie di segnalazione intracellulare evolutivamente conservate, che permettono all'ospite di riconoscere gli stimoli microbici e di tradurli in risposte effettrici appropriate. Queste vie costituiscono il livello di integrazione molecolare dell'immunità innata e rappresentano un elemento centrale per comprendere i meccanismi di immunomodulazione osservabili in questo modello (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018). Tra i principali pathway coinvolti si annoverano le vie Toll e IMD, funzionalmente analoghe ai circuiti Toll-like receptor e TNF-like dei vertebrati. La via Toll viene attivata prevalentemente in risposta a componenti di microrganismi Gram-positivi e funghi, mentre la via IMD risponde in modo preferenziale a stimoli derivanti da batteri Gram-negativi, sebbene tale distinzione non sia assoluta e presenti sovrapposizioni funzionali (Mukherjee et al., 2010; Wojda, 2017). L'attivazione di queste vie porta alla traslocazione nucleare di fattori di trascrizione della famiglia NF- κ B, quali dorsal e *relish*, che regolano l'espressione di numerosi geni coinvolti nella risposta immunitaria innata, inclusi quelli codificanti i peptidi antimicrobici, consentendo una risposta rapida e modulabile in base alla natura e all'intensità dello stimolo microbico (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018). Accanto alle vie Toll e IMD, anche la via JAK/STAT svolge un ruolo rilevante nell'immunità innata. Questo pathway è coinvolto nella regolazione delle risposte sistemiche, nella comunicazione tra compartimenti tissutali e nella modulazione dell'intensità della risposta infiammatoria, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi immunitaria e alla prevenzione di risposte eccessive potenzialmente dannose per l'ospite (Mukherjee et al., 2010; Wojda, 2017). La presenza e la funzionalità di questa via in un modello invertebrato sottolineano il grado di conservazione evolutiva dei principali meccanismi dell'immunità innata. Un aspetto di particolare interesse è la capacità di questi pathway di integrare segnali derivanti non solo da microrganismi patogeni, ma anche da stimoli microbici non patogeni o potenzialmente benefici. La modulazione delle vie Toll, IMD e JAK/STAT da parte di batteri commensali o con potenziale probiotico consente infatti di indurre risposte immunitarie controllate, caratterizzate da un'attivazione selettiva dei pathway piuttosto che da una risposta infiammatoria massiva (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018). La possibilità di monitorare l'attivazione di tali vie di segnalazione mediante analisi molecolari, quali la quantificazione dell'espressione genica di mediatori chiave, rende *G. mellonella* un modello particolarmente idoneo allo studio dei meccanismi di immunomodulazione indotti da microrganismi e loro componenti bioattive (Wojda, 2017; Sheehan et al., 2018; Cutuli et al., 2019).

RAZIONALE

L'interesse crescente per i LAB come agenti probiotici ha messo in evidenza un problema strutturale della ricerca nel settore: la profonda eterogeneità tra ceppi appartenenti alla stessa specie rende inadeguati gli approcci di selezione basati unicamente sui criteri tassonomici o su saggi *in vitro*. Molti degli effetti attribuiti ai LAB, in particolare la modulazione dell'immunità innata, l'attività antimicrobica e l'interazione con le barriere biologiche, emergono infatti solo in modelli viventi e non possono essere correttamente predetti in sistemi cellulari semplificati. Ad oggi, i modelli animali vertebrati rappresentano il riferimento per lo studio *in vivo* di tali interazioni, ma il loro impiego è limitato da vincoli etici, normativi ed economici che ne rendono poco sostenibile l'utilizzo nelle fasi di screening iniziale. In questo scenario si colloca la necessità di disporre di sistemi preclinici alternativi di screening che consentano una valutazione *in vivo* biologicamente informativa, ma al tempo stesso rapida, riproducibile e coerente con i principi delle 3R. Tra i modelli invertebrati disponibili, *G. mellonella* si distingue per la presenza di un sistema di immunità innata funzionalmente organizzato, per la possibilità di essere mantenuta a temperature fisiologiche per l'uomo e per la disponibilità di readout quantitativi che includono sopravvivenza, melanizzazione, parametri cellulari dell'emolinfa ed espressione genica di mediatori immunitari. Nonostante queste caratteristiche, l'impiego di *G. mellonella* come modello per lo studio funzionale dei LAB è stato finora solo parzialmente esplorato. Risulta pertanto necessario validare e integrare approcci sperimentali che permettano di collocare i ceppi di LAB lungo un continuum funzionale che vada dalla semplice tollerabilità alla capacità di indurre risposte immunomodulatorie o protettive biologicamente rilevanti. La presente tesi nasce da questa esigenza e si propone di valutare *G. mellonella* non soltanto come modello alternativo per lo studio della virulenza microbica, ma come vero e proprio sistema-filtro preclinico, capace di orientare in modo razionale la selezione dei ceppi di LAB in modelli vertebrati, ottimizzando l'efficienza e la sostenibilità dell'intera pipeline di ricerca.

SCOPO

Il presente lavoro si inserisce nell'ambito di ricerca del Prof. Roberto Di Marco, leader del Laboratorio di Microbiologia Clinica del Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute dell'Università degli Studi del Molise e del Laboratorio di Microbiologia Farmaceutica del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Catania, proseguendo e ampliando il lavoro del Dott. Marco Alfio Cutuli sull'impiego di *G. mellonella* come modello alternativo per lo studio dell'interazione ospite-microbo. Nel corso dei tre anni di dottorato, tale approccio è stato ulteriormente consolidato attraverso l'ottimizzazione del metodo di iniezione larvale e l'implementazione di nuovi metodi sperimentali, tra cui quello di ferita da ustione (wound burn) e quello di somministrazione orale (gavage). Ciò ha consentito di amplificare le potenzialità applicative di *G. mellonella* nello studio delle risposte infettive e immunitarie, rendendo il modello più versatile, riproducibile e standardizzabile. Sulla base dei risultati ottenuti, i protocolli sviluppati sono stati applicati allo studio dei batteri lattici, inizialmente utilizzando ceppi commerciali provenienti da collezioni internazionali (ATCC, DSMZ) e successivamente includendo, in collaborazione con la Dott.ssa Noemi Venditti, ceppi di LAB isolati da latte materno umano, al fine di aumentare la rilevanza biologica dello studio. Un ulteriore passo avanti è stato lo sviluppo di un protocollo per l'estrazione, la retrotrascrizione e l'amplificazione di RNA dalle larve di *G. mellonella*, sia dall'emolinfa sia da altri tessuti biologici, con lo scopo di monitorare mediante RT-PCR le variazioni di espressione genica dell'immunità innata indotte da stimoli microbici e biochimici. Al fine di aumentare la rilevanza traslazionale del modello, è stato anche identificato e validato un pannello di geni chiave con omologhi e/o ortologhi funzionali nell'uomo. Nel complesso, la presente tesi intende dimostrare la validità di *G. mellonella* come modello preclinico alternativo per lo screening funzionale di ceppi di LAB con potenziale probiotico, capace di fornire indicazioni preliminari attendibili prima del proseguo nei modelli animali vertebrati.

A tal fine, la tesi si propone di perseguire i seguenti obiettivi specifici:

1. Valutare l'efficacia del modello *G. mellonella* come sistema preclinico alternativo per lo studio dell'attivazione immunitaria indotta da diversi ceppi di LAB;
2. Indagare il potenziale antimicrobico e immunomodulatorio dei LAB in modelli di infezione sistemica, cutanea e intestinale nella larva di *G. mellonella*;

3. Effettuare una caratterizzazione preliminare delle BEVs isolate dai LAB al fine di valutarne le potenziali proprietà probiotiche.

I dati presentati derivano da una serie di studi sperimentali, alcuni già pubblicati e altri in corso di pubblicazione, in accordo con i principi delle 3R e con le direttive europee sulla sperimentazione animale.

MATERIALI E METODI

Sostanze chimiche e materiali

Attività 1:

Il terreno De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) è stato acquistato da Liofilchem e preparato secondo le istruzioni del produttore (62 g/L, pH 6,2).

È stato utilizzato il TRIzol Reagent User Guide (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

La retrotrascrizione del cDNA è stata eseguita mediante kit di trascrizione inversa (Applied Biosystems™) con inibitore dell'RNasi.

Le reazioni di qRT-PCR sono state condotte utilizzando PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems).

L'acqua sterile per biologia molecolare (trattata con DEPC, priva di nucleasi e proteasi) è stata acquistata da HiMedia.

Attività 2:

Il terreno De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) è stato acquistato da Liofilchem e preparato secondo le istruzioni del produttore (62 g/L, pH 6,2).

Il terreno Muller-Hinton (MH) è stato acquistato da Liofilchem e preparato secondo le istruzioni del produttore (21 g/L, pH 7,3).

TRIZOL Reagent User Guide (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

Formulazione topica di gentamicina prodotta da MSD Italia s.r.l.

Cloruro di sodio (NaCl, M=58,44 g/mol) acquistato da PanReac AppliChem.

Kit per trascrizione inversa di cDNA (Applied Biosystems™) con inibitore di RNase.

qRT-PCR eseguita utilizzando PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems).

Acqua sterile e di grado molecolare (trattata con DEPC, priva di nucleasi e proteasi) acquistata da HiMedia.

Attività 3:

Il terreno De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) è stato acquistato da Liofilchem e preparato secondo le istruzioni del produttore (62 g/L, pH 6,2). Il terreno Müller-Hinton (MH) è stato acquistato da Liofilchem e preparato secondo le istruzioni del produttore (21 g/L, pH 7,3). Il

TRIzol Reagent User Guide (Invitrogen, Waltham, MA, USA) è stato utilizzato per l'estrazione dell'RNA. Il cloruro di sodio (NaCl, M = 58,44 g/mol) è stato acquistato da PanReac AppliChem. Per la retrotrascrizione del cDNA è stato impiegato il kit Applied Biosystems™ contenente inibitore RNasi. Le reazioni di qRT-PCR sono state condotte utilizzando il PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems). L'acqua sterile di grado biologico molecolare (trattata con DEPC, priva di nucleasi e proteasi) è stata acquistata da HiMedia.

Attività 4:

Tutti i reagenti chimici utilizzati nel presente studio erano di grado analitico o HPLC-grade e sono stati impiegati secondo le indicazioni dei produttori, salvo diversa specifica.

Il terreno di coltura MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) è stato acquistato da Oxoid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). L'inulina utilizzata come substrato prebiotico è stata fornita da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Il PBS (Phosphate Buffered Saline), l'urea, il Tris-HCl, l'acido formico (FA), l'acido trifluoroacetico (TFA), il ditioneitrato (DTT), la 2-iodoacetamide (IAA), il bicarbonato di ammonio (AB) e l'acido acetico sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

La tripsina sequencing grade impiegata per la digestione proteolitica è stata acquistata da Promega (Madison, WI, USA).

I filtri Nanosep con cutoff molecolare di 10 kDa sono stati acquistati da Pall Corporation (Portage, MI, USA). I dispositivi di concentrazione Amicon® Ultra sono stati forniti da Merck Millipore (Darmstadt, Germania).

I solventi per LC-MS/MS, tra cui acqua, acetonitrile e acido formico HPLC-grade, sono stati acquistati da Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Le membrane da filtrazione da 0,22 µm, le piastre per saggi antibiofilm, le provette sterili, i puntali per micropipette, le microprovette per ultracentrifugazione e l'altro materiale di consumo sono stati forniti da Eppendorf (Amburgo, Germania), Falcon/Corning (Corning, NY, USA) e Sarstedt (Nümbrecht, Germania).

Acqua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Coltivazione dei ceppi batterici e preparazione degli inoculi

Attività 1:

I ceppi *L. kefiri* DSM 10551 (LK) e *L. plantarum* ATCC 14917 (LP) sono stati conservati a -80 °C in glicerolo al 20%. Dopo lo scongelamento, i ceppi LAB sono stati strisciati su piastre di agar MRS e incubati a 37 °C in condizioni microaerofile per 2472 ore, fino all'osservazione di una crescita visibile. Successivamente, una singola colonia per ciascun ceppo è stata trasferita in brodo MRS e coltivata alle stesse condizioni. Le colture batteriche sono state centrifugate e risospese in soluzione salina fino a raggiungere una densità ottica di 0,15 a 600 nm (PerkinElmer Wallac Victor 1420 Multilabel), corrispondente a $1,3 \pm 0,2 \times 10^8$ CFU/ml (determinata mediante conteggio su piastra).

Attività 2:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (PA) conservato a -80 °C in glicerolo al 20%.

LAB non commerciali: *Leuconostoc citreum* DSM 34870 (L1), *Limosilactobacillus fermentum* DSM 34871 (L2), DSM 34872 (L3), DSM 34873 (L4), conservati a -80 °C in glicerolo al 20%.

LAB commerciali: *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LR), *Lentilactobacillus kefiri* DSM 32079 (LK), *Lactoplantibacillus plantarum* ATCC 14917 (LP), conservati a -80 °C in glicerolo al 20%.

I ceppi di LAB sono stati inoculati in provette da 15 ml e in piastre Petri contenenti terreno MRS. Le colture sono state incubate in condizioni anaerobiche utilizzando sacchetti generanti gas anaerobico Anerogen (Thermo Scientific Diagnostic B.V., Landsmeer, Paesi Bassi) per 48 ore a 37 °C (Linares-Morales et al., 2022).

Il ceppo di *P. aeruginosa* è stato seminato su terreno MH e incubato per 24 ore a 37 °C (Sharma et al., 2020).

L'inoculo di *P. aeruginosa* ATCC 27583 è stato preparato da coltura overnight in brodo MH, centrifugato e sospeso in soluzione salina fino a una densità ottica di 0,1 a 600 nm OD, corrispondente a $1,3 \pm 0,2 \times 10^8$ UFC/ml (Alghoribi et al., 2014).

Attività 3:

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium Clinical Isolate (CI) 4562 (St) ed *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Ef) sono stati conservati a -80 °C in glicerolo al 20%.

Limosilactobacillus fermentum DSM 34872 (L3), isolato da latte materno umano, è stato anch'esso conservato a -80 °C in glicerolo al 20%.

Il ceppo L3 è stato seminato in piastre Petri contenenti terreno MRS. La coltura è stata incubata in condizioni anaerobiche mediante bustine generatrici di gas anaerobico Anerogen (Thermo Scientific Diagnostic B.V., Landsmeer, Paesi Bassi) per 48 ore a 37 °C. I ceppi Ef ATCC 29212 e St CI 4562 sono stati seminati in piastre contenenti terreno MH e incubati per 24 ore a 37 °C.

Attività 4:

I ceppi *Limosilactobacillus fermentum* DSM 34871 (L2), DSM 34872 (L3) e DSM 34873 (L4) sono stati conservati a -80 °C in MRS contenente glicerolo al 20%. I ceppi sono stati risvegliati in terreno MRS e incubati a 37 °C in condizioni di anaerobiosi.

Acquisizione e allevamento delle larve di *Galleria mellonella*

Attività 1:

Le larve di *G. mellonella* sono state acquistate da un fornitore locale (Arcobaleno Pesca Sport, Campobasso, Italia) e utilizzate per stabilire una colonia presso il Laboratorio di Entomologia Agraria (Dipartimento di Scienze Agrarie, Ambientali e Alimentari, Università del Molise, Italia). L'allevamento è stato condotto in contenitori di vetro (40 cm di altezza × 20 cm di diametro) a 28 °C e 40% di umidità relativa, in completa oscurità (0L:24D). La dieta artificiale delle larve è stata preparata combinando diverse formulazioni riportate in letteratura (Firacative et al., 2020; Jorjão et al., 2018; Metwally et al., 2012; Mohamed & Amro, 2022; Xue et al., 2023) e comprendeva i seguenti ingredienti: 300 g di farina di soia (30%), 150 g di farina di mais (15%), 150 g di farina di frumento tipo 1 (15%), 100 g di latte in polvere (10%), 48 g di estratto di lievito (4,8%), 150 g di glicerolo (15%), 100 g di sciroppo di zucchero invertito (10%) e 2 g di integratore multivitaminico (0,2%). Per tutti gli esperimenti sono state utilizzate larve all'ultimo stadio, di peso compreso tra 270 e 330 mg, prive di marcature grigiastre, come descritto da Fuchs et al. (2010).

Attività 2 e 3:

Le larve sono state ottenute secondo il protocollo descritto nel precedente lavoro di Venditti et al. (Venditti et al., 2021). *G. mellonella* è stata fornita da SA.GI.P. s.a.s. (Ravenna, Italia), mantenuta a 15 °C al buio fino all'utilizzo, e impiegata per gli esperimenti dopo 2 giorni di acclimatazione a 35 °C. Per tutti gli esperimenti sono state utilizzate larve all'ultimo stadio di sviluppo (last instar), del peso compreso tra 270 e 330 mg, prive di marcature grigiastre.

Analisi statistica

Nell'attività 1, i dati sono stati analizzati mediante il software statistico R, versione 4.4.0. L'adeguatezza della distribuzione normale è stata valutata con il test di Shapiro-Wilk, con livello di significatività impostato a $p < 0,05$. Per i valori normalmente distribuiti è stata applicata un'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) ($p < 0,05$) per valutare le differenze tra gruppi, seguita dal test post hoc di Tukey per l'identificazione delle significatività a coppie. L'assunzione di omogeneità delle varianze è stata verificata mediante il test di Levene. Per i dati non normalmente distribuiti è stato impiegato il test non parametrico di Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), seguito dal test post hoc di Dunn con correzione di Bonferroni per confronti multipli. Il coefficiente di correlazione di rango di Spearman è stato utilizzato per valutare la correlazione tra i livelli di espressione genica. I risultati statistici completi sono disponibili nel repository dati (10.6084/m9.figshare.29655497).

Nell'attività 2, l'analisi di sopravvivenza è stata stimata con il metodo di Kaplan-Meier, con significatività calcolata mediante approssimazione log-rank del test chi-quadro (Wang et al., 2023). I dati qRT-PCR sono stati confrontati mediante ANOVA a una via con test di confronto multiplo di Tukey (Liang et al., 2022). I coefficienti di correlazione sono stati calcolati con metodo non parametrico di Spearman. Le analisi statistiche sono state effettuate con SPSS Version 26.0 (Armonk, NY: IBM Corp).

Nell'attività 3, i dati sono stati analizzati utilizzando RStudio 2025 (R version 4.2.2) o GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). La normalità della distribuzione dei dati è stata verificata mediante test di Shapiro-Wilk; in presenza di distribuzione normale ($p > 0,05$) è stata applicata un'ANOVA a una via, seguita dal test post hoc di Tukey, mentre in caso contrario si è utilizzato il test di Kruskal-Wallis, seguito dal test post hoc di Dunn con correzione di Bonferroni per confronti multipli. Per i confronti intestino vs emolinfa, la normalità è stata valutata mediante test di Shapiro-Wilk; se entrambe le distribuzioni risultavano normali ($p > 0,05$), è stato applicato un t-test bilaterale, altrimenti un test U di Mann-Whitney. Sono state riportate solo le differenze statisticamente significative ($p < 0,05$), con indicazione del livello di significatività tramite lettere differenti o asterischi (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). L'analisi di sopravvivenza Kaplan-Meier e le differenze statistiche tra le curve di sopravvivenza sono state valutate mediante test log-rank (Mantel-Cox).

Attività 1: Valutazione funzionale *in vivo* della risposta immunitaria innata ai batteri lattici nel modello preclinico *Galleria mellonella*: confronto tra *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lentilactobacillus kefir*.

Razionale dello studio

Le proprietà immunomodulanti dei probiotici sono state oggetto di numerosi studi. Questi microrganismi sono in grado di modulare sia la risposta immunitaria innata sia quella adattativa. Nel comparto adattativo, è noto che promuovono l'espansione delle cellule T regolatorie e influenzano il profilo citochinico Th1/Th2. Gli effetti sulla risposta immunitaria innata sono mediati dall'interazione con le cellule epiteliali mucosali e dall'attivazione dei recettori di riconoscimento del pattern (pattern recognition receptors, PRR) espressi dalle cellule dell'immunità innata, con conseguente attivazione delle vie di segnalazione a valle e modulazione della produzione di citochine (Ashaolu et al., 2025). Tra i probiotici, i LAB esercitano i loro effetti immunomodulanti innati attraverso meccanismi ceppo-specifici che coinvolgono componenti strutturali quali peptidoglicano, acidi lipoteicoici (LTA), acidi teicoici e esosaccaridi extracellulari (EPS) (Rahbar Saadat et al., 2019). Queste molecole vengono riconosciute dai PRR, tra cui i TLR, i NOD-like le lectine di tipo C, espressi sulle cellule epiteliali mucosali, sui macrofagi e sulle cellule dendritiche. Il legame di tali recettori determina l'attivazione di vie di segnalazione intracellulari, in particolare NF- κ B e MAPK, modulando in modo fine la produzione di citochine (Kim et al., 2008). A seconda del ceppo e del contesto dell'ospite, i LAB possono sopprimere citochine pro-infiammatorie, come TNF- α , IL-6 e IL-8, e al contempo favorire la produzione di mediatori anti-infiammatori, quali IL-10 e TGF- β . Inoltre, molti ceppi stimolano la secrezione di peptidi antimicrobici (AMP), tra cui β -defensine umane e catelicidine (Martín et al., 2014). Attraverso queste azioni, i LAB contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi immunitaria, alla mitigazione dell'infiammazione eccessiva e al rafforzamento delle difese di prima linea contro gli agenti patogeni (Cesare et al., 2020; Adejumo et al., 2023). I LAB, in particolare quelli precedentemente inclusi nel vasto genere *Lactobacillus*, sono tra i più studiati per le loro proprietà benefiche e immunomodulanti. In seguito a una revisione tassonomica di ampia portata basata sulla filogenomica dell'intero genoma, il genere *Lactobacillus* è stato riclassificato in 25 nuovi generi, per riflettere in modo più accurato la diversità genetica e funzionale (Zheng et al., 2020). Tra questi, i generi *Lactiplantibacillus* e *Lentilactobacillus* rappresentano due linee evolutive distinte con un

potenziale probiotico ben caratterizzato. *Lactiplantibacillus plantarum* è noto per la sua capacità di colonizzare diversi ambienti associati all'uomo, in particolare il tratto gastrointestinale. Nel microbiota intestinale, contribuisce al mantenimento dell'integrità della barriera epiteliale, modula le risposte immunitarie e ha dimostrato un potenziale terapeutico in varie condizioni infiammatorie e immunomediate, tra cui le malattie infiammatorie intestinali, la dermatite atopica e la disbiosi orale (Chatsirisakul et al., 2025). *Lentilactobacillus kefir*, tipicamente isolato da prodotti lattiero-fermentati come il kefir, ha recentemente attirato l'attenzione per le sue proprietà immunomodulanti e antimicrobiche specifiche di ceppo a livello delle superfici mucosali. Studi recenti hanno mostrato che *L. kefir* esercita effetti anti-infiammatori sia in modelli *in vitro* sia *in vivo*, inclusi modelli di cellule epiteliali intestinali stimulate con LPS e modelli murini di colite (Manna et al., 2023). Il crescente interesse clinico e commerciale verso i probiotici ha messo in evidenza la necessità di una validazione funzionale rigorosa e di un quadro normativo chiaro. Nell'Unione Europea, i probiotici commercializzati come alimenti o integratori sono regolamentati dal Regolamento (CE) n. 1924/2006 (Regulation - 1924/2006 - EN - EUR-Lex, n.d.), che non richiede studi clinici per la commercializzazione. Tuttavia, ogni indicazione salutistica deve essere supportata da prove scientifiche solide, generalmente comprendenti studi clinici randomizzati controllati (RCT) valutati dall'EFSA (EFSA Panel on Dietetic Products, 2016, 2021). Sempre più spesso, i probiotici vengono sviluppati come agenti terapeutici, soggetti a requisiti regolatori simili a quelli applicati ai farmaci biologici, che includono processi di produzione ben definiti, rigorosi controlli di qualità e solide evidenze precliniche e cliniche di efficacia e sicurezza, portando alla classificazione di questi prodotti come Live Biotherapeutic Products (LBP) (Spacova et al., 2023; Garg et al., 2024). Per soddisfare tali requisiti, si pone sempre maggiore enfasi sulla generazione di dati meccanicistici che chiariscano come specifici ceppi siano in grado di modulare le risposte immunitarie dell'ospite. Ciò include, ma non si limita a, identificare gli effettori molecolari coinvolti, le loro interazioni con i recettori di riconoscimento del pattern sulle cellule immunitarie e la modulazione a valle delle vie di segnalazione. Parallelamente, i quadri regolatori internazionali volti a ridurre l'impiego di vertebrati nella ricerca, come la Direttiva Europea 2010/63/UE e le linee guida dell'OCSE (Directive - 2010/63 - EN - EUR-Lex, n.d.), sottolineano la necessità di modelli alternativi eticamente sostenibili nella sperimentazione preclinica (Cutuli et al., 2021; Venditti et al., 2021; Petronio Petronio et al., 2022). Negli ultimi anni, *G. mellonella*, la falena della cera maggiore, è emersa come un modello *in vivo* di grande valore per lo studio delle interazioni ospite-microbo e per la validazione degli effetti immunomodulanti (Cutuli et al., 2019). Sebbene l'immunità innata dei

mammiferi sia stata ampiamente studiata, quella degli insetti, in particolare al di fuori del modello classico *D. melanogaster*, rimane meno esplorata. È stato dimostrato che la somministrazione di probiotici in *Drosophila* aumenta la sopravvivenza (Erkosar et al., 2013); analogamente, probiotici come *E. coli* Nissle 1917 (EcN1917) hanno mostrato di migliorare la sopravvivenza e modulare le risposte immunitarie in *G. mellonella* infettata da patogeni (Menta et al., 2025). *G. mellonella* presenta vantaggi peculiari, tra cui la termotolleranza a 37 °C e una struttura immunitaria innata più complessa. Pur priva di immunità adattativa, *G. mellonella* possiede un sistema immunitario innato altamente organizzato e responsivo ai patogeni, costituito da componenti sia cellulari sia umorali (Cutuli et al., 2019). Gli emociti mediano fagocitosi, incapsulamento, coagulazione e segnalazione, e vengono rapidamente reclutati in risposta all'infezione per generare specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (Bergin et al., 2005). Parallelamente, le difese umorali sono attivate attraverso la cascata della fenolossidasi, che porta alla melanizzazione del patogeno (Bergin et al., 2005), e all'induzione trascrizionale di peptidi antimicrobici come *gallerimycin* e *gloverina*, tramite le vie di segnalazione Toll e IMD, evolutivamente conservate (Vogel et al., 2011). Queste risposte immunitarie integrate rendono *G. mellonella* un modello robusto e di elevata rilevanza traslazionale per lo studio delle dinamiche ospite-patogeno. Il presente studio si propone di utilizzare *G. mellonella* come modello *in vivo* alternativo per caratterizzare gli effetti immunomodulanti di *L. plantarum* ATCC 14917 (LP) e *L. kefir* DSM 10551 (LK), analizzando la cinetica di espressione di un pannello selezionato di geni correlati all'immunità innata. L'analisi si concentra sui principali regolatori delle cascate di segnalazione Toll e IMD, quali la proteina di polarità embrionale *dorsal* (Dorsal), *relish* (Rel) e *caudal type homeobox* (cad), oltre al recettore Toll 7 (18w) e al ligando di tipo citochinico contenente il dominio *Spaetzle* (*spz4*). Sono stati inoltre considerati effettori antimicrobici, tra cui *gallerimycin* e *gloverin*, l'enzima ossidativo *NADPH oxidase 4-like* implicato nella distruzione microbica mediata da ROS, e geni effettrici immunitari associati alla protezione tissutale (*IMPI*) e alla fagocitosi (*Hem*). Questo pannello genico fornisce una panoramica completa del profilo di attivazione immunitaria dell'ospite in risposta alla somministrazione di LAB, comprendendo risposte umorali, ossidative e cellulari. Tali risultati mirano a definire gli effetti immunomodulanti specifici di ceppo di LP e LK e a consolidare ulteriormente l'impiego di *G. mellonella* come modello alternativo efficace per lo screening funzionale dei LAB con potenziali applicazioni cliniche.

Iniezione dei ceppi di *Lactobacillus* in *Galleria mellonella*

Diluizioni seriali (10^4 - 10^6 CFU/larva) di ciascun inoculo batterico sono state somministrate per iniezione secondo Vertyporokh & Wojda (Vertyporokh and Wojda, 2020), con alcune modifiche. In breve, le larve sono state sottoposte a digiuno per 48 ore prima dell'iniezione. Le superfici addominali sono state disinfettate con etanolo al 70% e le larve sono state poste a 4 °C per 5 minuti per indurre anestesia da freddo. Un volume di 10 µl è stato iniettato nell'ultima pseudozampa sinistra mediante una siringa per insulina da 0,5 ml (BD Micro-Fine; ago 0,33 mm × 12,7 mm). Le larve sono state assegnate casualmente ai gruppi sperimentali e iniettate con le diverse diluizioni batteriche o con PBS (gruppo di controllo). Dopo l'iniezione, le larve sono state incubate a 37 °C al buio, in condizioni di digiuno, e monitorate a intervalli regolari per 72 ore. Tutte le manipolazioni sono state effettuate in condizioni sterili. Per verificare l'efficacia della disinfezione, tamponi prelevati dalla cuticola larvale sono stati seminati su agar CLED e incubati a 37 °C per 48 ore.

Monitoraggio della sopravvivenza e valutazione dell'indice di salute

Per determinare la concentrazione subletale degli inoculi di *Lactobacillus*, la sopravvivenza larvale è stata monitorata ogni 24 ore fino a 72 ore. Le larve sono state considerate morte in assenza di movimento dopo una stimolazione delicata con pinzette. Lo stato di salute di *G. mellonella* è stato valutato utilizzando un indice di salute adattato da Loh et al. (Loh et al., 2013) e modificato per riflettere la risposta ai trattamenti probiotici. L'indice valuta quattro parametri osservabili: motilità, formazione del bozzolo, grado di melanizzazione e sopravvivenza. Ogni parametro è stato valutato secondo criteri comportamentali e morfologici definiti (Tabella 1). Il punteggio massimo attribuibile a una larva sana era pari a 10. Le osservazioni sono state effettuate a 24, 48 e 72 ore post-iniezione. La valutazione è stata condotta indipendentemente da due osservatori in cieco per garantire l'obiettività dei risultati. Sulla base dell'indice di salute, è stata adottata per tutti i successivi saggi una concentrazione di 10^5 CFU/larva.

Tabella 1. Indice di salute di Galleria mellonella (Loh et al., 2013)

Categoria	Descrizione	Score
Attività	Nessuna attività	0
	Minima attività in seguito a stimolazione	1
	Attività in seguito a stimolazione	2
	Attività senza stimolazione	3
Impupamento	Nessun bozzolo	0
	Bozzolo parziale	0.5
	Bozzolo completo	1
Melanizzazione	Melanizzazione totale	0
	$\geq 40\%$ superficie corporea melanizzata	1
	20-40% melanizzata	2
	$< 20\%$ melanizzata	3
	Nessuna melanizzazione	4
Sopravvivenza	Morta	0
	Viva	2

Allineamento in silico delle proteine immuno-correlate di *Galleria mellonella* con i potenziali ortologi umani

Per indagare la possibile ortologia tra le proteine immuno-correlate di *G. mellonella* e i loro corrispettivi umani, è stato applicato un workflow analitico sequenziale. Le sequenze dei primer impiegati per l'analisi di espressione genica (Tabella 2) sono state utilizzate per recuperare gli mRNA di *G. mellonella* dal database NCBI Primer-BLAST RefSeq mRNA (*G. mellonella* NCBI: txid 7137). Le sequenze nucleotidiche risultanti sono state tradotte in sequenze proteiche mediante il database NCBI RefSeq. Ogni sequenza proteica di *G. mellonella* è stata quindi allineata con il proteoma umano (*Homo sapiens*, NCBI: txid 9606) utilizzando BLASTP con parametri di default. Quando veniva individuato un allineamento significativo, la regione corrispondente è stata estratta per le analisi successive e valutata mediante la matrice di sostituzione BLOSUM62, standard per le ricerche di omologia proteica (Henikoff and Henikoff, 1992; Mount et al., 2007). In assenza di omologia significativa, è stata mantenuta la proteina di *G. mellonella* a lunghezza completa. Gli allineamenti a coppie tra le proteine *query* e *subject* sono stati quindi analizzati colonna per colonna per derivare una sequenza consenso conservativa. I residui identici sono stati inclusi direttamente nella sequenza consenso, mentre le sostituzioni conservative, classificate in base ai principali gruppi chimico-fisici (idrofobici, carichi positivamente, carichi negativamente, polari non carichi e speciali), sono state risolte mantenendo il residuo presente nella sequenza *query*. Le sostituzioni non conservative sono state annotate come "X", mentre i gap sono stati rappresentati con il residuo conservato, o come "-" in caso di doppio gap. Questo approccio ha permesso di ottenere sequenze consenso che catturano le caratteristiche conservate e funzionalmente rilevanti tra tutte le regioni allineate (Capra and Singh, 2007). Le sequenze consenso sono state analizzate per l'annotazione dei domini conservati, l'assegnazione alle famiglie proteiche e le funzioni molecolari previste utilizzando il database InterPro (release 106.0, 19 giugno 2025). Tutti i file di allineamento (formato FASTA) sono disponibili nei Materiali Supplementari, mentre le sequenze consenso e i file di analisi InterPro (formato JSON) sono depositati nel data repository (10.6084/m9.figshare.29655497).

Tabella 2. Sequenze dei primer utilizzate per i geni target in questo studio. I geni contrassegnati da un asterisco (*) non possiedono un simbolo genico ufficiale e sono indicati con una denominazione generica; l'identificativo ufficiale è fornito dal corrispondente numero LOC.

Gene	Descrizione	Numero di accesso (mRNA)	ID LOC	Sequenza primer (5' → 3')	Riferimento
<i>eEF1alpha1</i>	fattore di allungamento 1-alfa	<i>XM_026903443.1</i>	<i>LOC113518486</i>	Fw: AACCTCCTTACAGTGAATCC Rv: ATGTTATCTCCGTGCCAG	(Melo et al., 2013)
<i>Cad</i>	homeobox di tipo caudal	<i>XM_026909593.3</i>	<i>LOC113523598</i>	Fw: GCAAGAGCGGGCAATACGG Rv: CTCGCCTGGTTCTCTTTTCGG	(Sarvari et al., 2020)
<i>Dorsal</i>	proteina della polarità embrionale Dorsal	<i>XM_052899051.1</i>	<i>LOC113512577</i>	Fw: CGACGAATTCTACCTGTAAACC Rv: CACCAAACCTTTACTCGACATTT	(Sarvari et al., 2020)
<i>spz4</i>	proteina 4 contenente il dominio Spaetzle	<i>XM_031908808.2</i>	<i>LOC113517666</i>	Fw: AAAGAAGAAATGCAAGCTCCA Rv: AACTTAAACCAGTCAGCGAAG	(Sarvari et al., 2020)
<i>Rel</i>	Rel	<i>XM_052893440.1</i>	<i>LOC113515637</i>	Fw: TCCAAAAAGCACCCCTACAATCG Rv: GCACTTCGTAGCTCACATCTC	(Sarvari et al., 2020)
<i>18w*</i>	recettore Toll-like 7	<i>XM_026893057.3</i>	<i>LOC113509667</i>	Fw: CACTCGATTAGGCAACAACA Rv: TCCGAGACGATCAACACTTC	(Melo et al., 2013)
<i>gallerimycin *</i>	gallerimycin - like	<i>XM_026909420.3</i>	<i>LOC113523440</i>	Fw: AACCATCACCGTCAAGCCA Rv: TCGAAGACATTGACATCCATTGA	(Sarvari et al., 2020)
<i>gloverin *</i>	gloverin	<i>XM_026909162.3</i>	<i>LOC113523269</i>	Fw: AGATGCACGGTCCTACAG Rv: GATCGTAGGTGCCITTGTG	(Melo et al., 2013)
<i>NADPH oxidase 4-like*</i>	NADPH ossidasi 4-like	<i>XM_026901959.3</i>	<i>LOC113517309</i>	Fw: GCTTGACATTGAGCTGTCCA Rv: CCGTCCAATCACCTTTGACT	(Melo et al., 2013)
<i>Hem</i>	proteina 1 associata a Nck (Hem)	<i>XM_026899938.2</i>	<i>LOC113515675</i>	Fw: ATTGCTAGCCAGGTTTCAGGA Rv: AGCTATTGCGGAAACTCA	(Melo et al., 2013)
<i>IMPI *</i>	zonadhesina	<i>XM_052897463.1</i>	<i>LOC113511802</i>	Fw: TAGTAAGCAGTAGCATAGTCC Rv: GCCATCTTCACAGTAGCA	(Melo et al., 2013)

Estrazione dell'RNA, amplificazione del cDNA e analisi dell'espressione genica mediante qRT-PCR

A 3, 6, 12, 18 e 24 ore dall'infezione con *Lactobacillus*, le larve di *G. mellonella* sono state anestetizzate a 4 °C per 10 minuti. Successivamente, la parte terminale dell'addome è stata recisa con una lama chirurgica sterile (Swann Morton Limited, Sheffield S6 2BJ, England). L'emolinfa è stata raccolta in microprovette Eppendorf da 1,5 ml e mantenuta su ghiaccio per prevenire la melanizzazione (Moya-Andérico et al., 2020). L'RNA è stato estratto dall'emolinfa di ciascun gruppo larvale secondo il protocollo TRIzol Reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA). La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando il High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) con inibitore dell'RNasi, seguendo le istruzioni del produttore. La PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR) è stata condotta utilizzando 50 µl di PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems), con temperatura di annealing di 60 °C per 15 s per 35 cicli, seguita dall'analisi della curva di melting (68-95 °C). Le sequenze dei primer sono riportate nella Tabella 2. I risultati sono stati normalizzati rispetto al gene costitutivo *eEF1alpha1* e presentati come valori relativi rispetto alle larve trattate con PBS (gruppo di controllo), secondo il metodo $\Delta\Delta C_t$. Per ciascun trattamento e punto temporale, l'espressione genica è stata quantificata su tre repliche biologiche, ciascuna analizzata in duplicato. L'intero set di dati grezzi (valori C_t) è disponibile pubblicamente all'indirizzo DOI: 10.6084/m9.figshare.29655497.

Risultati

Sopravvivenza e stato di salute di Galleria mellonella

Non è stata osservata alcuna mortalità in nessuno dei gruppi sperimentali (LP, LK o controllo) durante il periodo di osservazione di 72 ore. Inoltre, le larve non hanno mostrato segni di stress, quali melanizzazione, ridotta mobilità o compromissione nella formazione del bozzolo (Tabella 1). I punteggi dell'indice di salute sono rimasti costantemente elevati in tutti i gruppi, con valori prossimi al massimo di 10; tali risultati sono in linea con quanto riportato da Rossoni et al. (Rossoni et al., 2017). Sulla base di questi dati, è stato selezionato un inoculo pari a $1,3 \pm 0,2 \times 10^5$ CFU/larva per i successivi saggi.

Allineamento in silico e annotazione funzionale dei domini conservati delle proteine immuno-correlate di G. mellonella

Le proteine immuno-correlate selezionate di *G. mellonella* sono state allineate con le corrispondenti sequenze proteiche di *Homo sapiens* (Tabella Supplementare 1). Sono stati registrati i principali parametri di allineamento (Bit score, copertura della query, valore E e percentuale di identità), utilizzando il Bit score come indicatore primario della forza dell'allineamento, in accordo con Altschul et al. (Altschul et al., 1997). Il più alto grado di similarità è stato riscontrato tra la proteina di membrana associata Hem (XP_026755739.2) e la proteina umana NCKAP1 (NP_038464.1), con un Bit score di 1459, copertura della query del 99%, E-value pari a 0,0 e un'identità del 61,85%. L'isoforma X1 di NADPH ossidasi 4-like (XP_026757760.2) ha mostrato un allineamento significativo con l'isoforma a della proteina umana NOX4 (NP_058627.2), con un Bit score di 281, copertura del 73%, E-value di $1e-85$ e identità del 33,95%. Tra i fattori di trascrizione, la proteina di polarità embrionale Dorsal (XP_052755011.1) si è allineata con la subunità umana NF- κ B p65 (NP_068810.3), producendo un Bit score di 242, copertura del 37%, E-value di $7e-70$ e identità del 45,14%. L'allineamento tra l'isoforma X1 di NF- κ B p110 (XP_052749400.1) e l'isoforma a di NF- κ B p100 umana (NP_001070962.1) ha mostrato un Bit score di 179, copertura del 31%, E-value di $4e-45$ e identità del 37,96%. Il confronto tra la proteina homeobox CDX-2 isoforma X2 (XP_026765394.1) e la CDX-2 umana isoforma 1 (NP_001256.4) ha prodotto un Bit score di 137, copertura del 36%, E-value di $6e-38$ e identità del 79,07%. La proteina simile a 18-wheeler/TLR7 (XP_026748858.2) si è allineata con la proteina umana SLIT1 (AAI46762.1), ottenendo un Bit score di 177, copertura del 61%, E-value di $2e-43$ e identità del 26,51%. Il

livello di similarità più basso è stato osservato tra l'inibitore inducibile delle metalloproteinasi (XP_052753423.1) e la mucina-6 umana isoforma X1 (XP_054187951.1), con un Bit score di 43.1, copertura del 22%, E-value di 0.015 e identità del 22,22%. È degno di nota che le proteine *spaetzle* (XP_031764668.1), *gloverin* (XP_026764963.2) e *gallerimycin* (XP_026765221.2) non hanno mostrato allineamenti significativi con sequenze umane; non sono stati recuperati risultati BLAST rilevanti per queste proteine. Tuttavia, l'analisi condotta con InterPro ha evidenziato domini e famiglie proteiche specifiche degli insetti, confermando la loro implicazione in funzioni immunitarie, come riportato nella Tabella Supplementare 1.

Modulazione differenziale dei geni immuno-correlati da parte di L. plantarum ATCC 14917 e L. kefiri DSM 10551

Analisi temporale mediante qRT-PCR

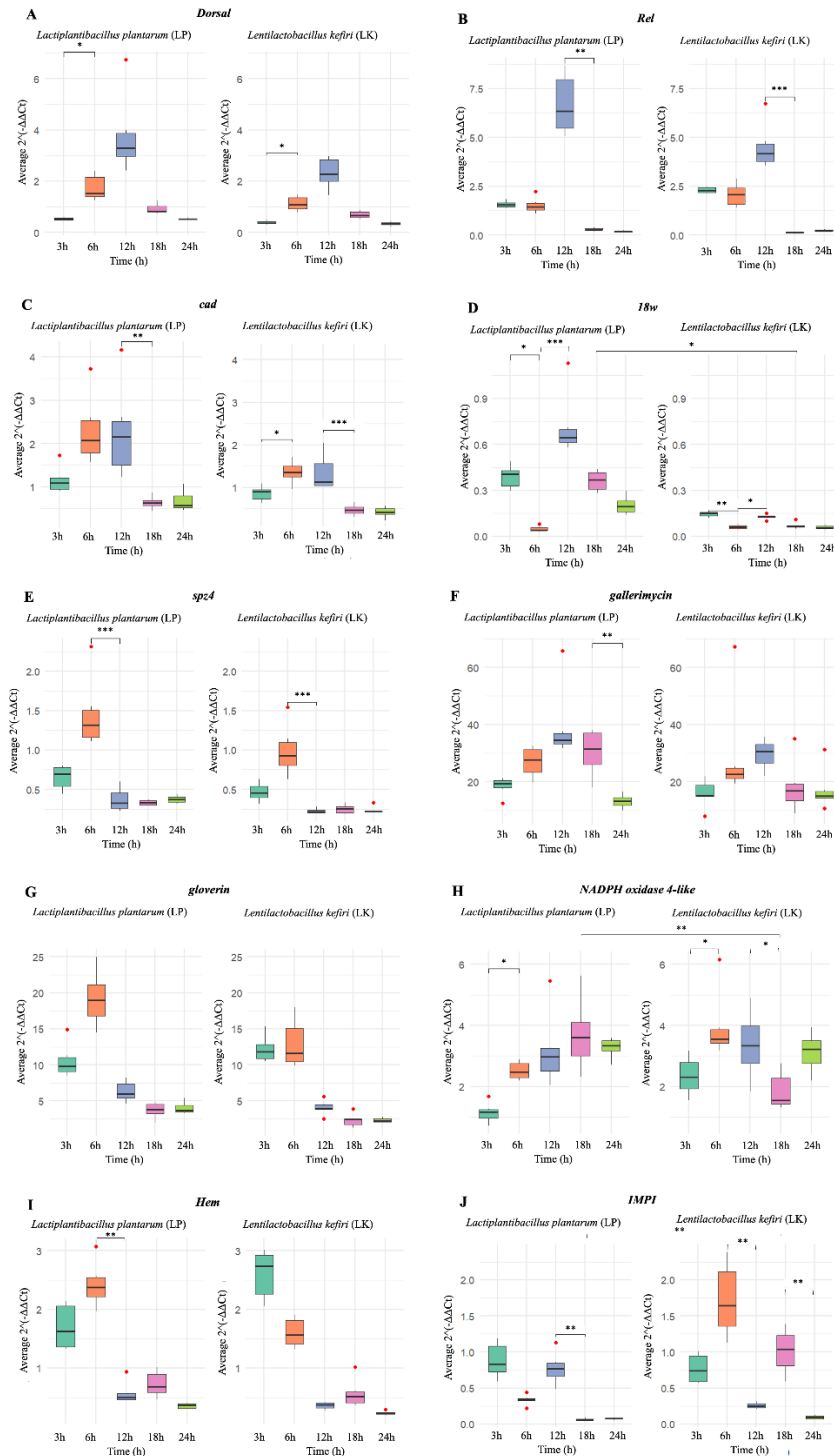
L'analisi qRT-PCR a corso temporale è stata impiegata per valutare i profili di espressione temporale di geni selezionati correlati all'immunità in larve di *G. mellonella* in seguito alla somministrazione di LP o LK. I risultati hanno evidenziato schemi distinti di modulazione genica tra i due ceppi probiotici nei diversi intervalli temporali analizzati (3, 6, 12, 18 e 24 ore post-somministrazione). Le variazioni di espressione (fold change, FC) e la loro significatività statistica sono riassunte nella Figura 1. Il gene *Dorsal* ha mostrato un pattern di espressione precoce e transitorio in entrambi i trattamenti, con un picco a 12 ore seguito da un declino successivo (Figura 1A). Nelle larve trattate con LP, l'espressione è aumentata in modo significativo da 3h ($M = 0,532$; $SD = 0,059$; mediana = 0,530), indicante una lieve downregulation ($0,5 \leq FC < 1$), a 6h ($M = 1,738$; $SD = 0,502$; mediana = 1,530), corrispondente a una lieve upregulation ($1 < FC \leq 2$) ($p < 0,05$), raggiungendo un massimo a 12h ($M = 3,775$; forte upregulation, $FC > 2$), seguito da un netto calo a 18h e 24h. In modo analogo, nelle larve trattate con LK, l'espressione è aumentata da 3h ($M = 0,390$; $SD = 0,068$; mediana = 0,375; forte downregulation, $FC < 0,5$) a 6h ($M = 1,127$; $SD = 0,290$; mediana = 1,085; lieve upregulation) ($p < 0,05$), con un picco a 12h ($M = 2,320$; forte upregulation) e successivo declino. Sebbene i profili temporali risultassero comparabili, le larve trattate con LP hanno mostrato valori di espressione assoluti costantemente più elevati, senza tuttavia differenze statisticamente significative tra i trattamenti nei medesimi punti temporali. Il gene *Rel* ha mostrato la massima espressione a 12h in entrambi i trattamenti (Figura 1B). Nei campioni trattati con LP, l'espressione ha raggiunto un valore massimo di $M = 6,677$ ($SD = 1,526$; mediana = 6,340), indicativo di una forte upregulation ($FC > 2$), seguita da una diminuzione

significativa a 18h (M = 0,297; SD = 0,085; mediana = 0,275; forte downregulation, $FC < 0,5$) ($p < 0,01$). Un andamento simile è stato osservato nelle larve LK, con un picco a 12h (M = 4,512; SD = 1,171; mediana = 4,155; forte upregulation) e un calo marcato a 18h (M = 0,113; SD = 0,033; mediana = 0,125; forte downregulation) ($p < 0,001$). Sebbene i profili temporali fossero analoghi, il trattamento LP ha indotto livelli di espressione più elevati in tutti i tempi, senza differenze significative tra LP e LK ai corrispondenti intervalli. Il gene *cad* ha mostrato un andamento temporale simile in entrambi i trattamenti, con un picco a 6h (Figura 1C). Nelle larve LP, l'espressione ha raggiunto un massimo a 6h (M = 2,305; SD = 0,799; mediana = 2,070; forte upregulation), seguito da un calo significativo tra 12h e 18h ($p < 0,01$), fino a una lieve downregulation a 18h (M = 0,638; SD = 0,145; mediana = 0,625; $0,5 \leq FC < 1$). Al contrario, nelle larve LK si è osservato un aumento significativo da 3h (M = 0,867; SD = 0,176; mediana = 0,905; lieve downregulation) a 6h (M = 1,362; SD = 0,262; mediana = 1,360; lieve upregulation) ($p < 0,05$), con livelli che si sono mantenuti elevati fino a 12h, per poi diminuire bruscamente a 18h (M = 0,475; SD = 0,125; mediana = 0,465; forte downregulation) ($p < 0,001$). Sebbene non siano state rilevate differenze significative tra LP e LK nei singoli punti temporali, i valori assoluti sono risultati costantemente superiori nel gruppo LP. Il gene *18w* ha mostrato un pattern bifasico in entrambi i trattamenti, con una prima induzione a 3h, un declino a 6h e un secondo incremento a 12h (Figura 1D). Nelle larve LP, il primo picco a 3h (M = 0,390; SD = 0,075; mediana = 0,405) corrispondeva a una forte downregulation ($FC < 0,5$), seguito da una riduzione significativa a 6h (M = 0,048; SD = 0,018; mediana = 0,040; $p < 0,05$). A 12h si è osservato un nuovo incremento significativo (M = 0,720; SD = 0,206; mediana = 0,645; lieve downregulation) ($p < 0,001$), dopo il quale l'espressione è progressivamente diminuita. Un andamento analogo è stato rilevato nelle larve LK, con un primo picco a 3h (M = 0,145; SD = 0,016; mediana = 0,150; forte downregulation), seguito da una riduzione significativa a 6h (M = 0,060; SD = 0,015; mediana = 0,060) ($p < 0,01$) e un secondo incremento a 12h (M = 0,127; SD = 0,016; mediana = 0,130) ($p < 0,05$). Pur mantenendo profili simili, LP ha indotto valori di espressione più elevati, in particolare a 18h ($p < 0,05$). Il gene *spz4* ha seguito una traiettoria simile in entrambi i trattamenti, con un picco marcato a 6h e un rapido declino successivo (Figura 1E). Nelle larve LP l'espressione ha raggiunto il massimo a 6h (M = 1,455; SD = 0,449; mediana = 1,315; lieve upregulation), seguita da una diminuzione significativa a 12h (M = 0,370; SD = 0,146; mediana = 0,325; forte downregulation, $p < 0,001$), mantenendosi poi bassa. Analogamente, nelle larve LK si è osservato un picco a 6h (M = 0,990; SD = 0,320; mediana = 0,925; lieve downregulation) e una riduzione significativa a 12h (M = 0,225; SD = 0,031; mediana = 0,215; $p < 0,001$). Pur senza differenze significative, LP ha

suscitato una risposta trascrizionale quantitativamente più marcata. L'espressione di *gallerimycin* ha raggiunto il picco a 12h in entrambi i gruppi, con livelli più elevati nelle larve LP e un declino progressivo successivo (Figura 1F). In LP, il valore massimo è stato registrato a 12h (M = 39,515; SD = 13,024; mediana = 34,540; forte upregulation), seguito da un calo significativo a 18h (M = 30,345; SD = 7,936; mediana = 31,365) e 24h (M = 13,087; SD = 2,356; mediana = 13,140) ($p < 0,05$). In LK, un picco analogo è stato osservato a 12h (M = 29,622; SD = 5,044; mediana = 30,495), seguito da una riduzione non significativa. I profili temporali risultavano simili, ma i valori assoluti di espressione erano costantemente superiori nel gruppo LP. Il gene *gloverin* ha mostrato un'attivazione precoce in entrambi i trattamenti, con un picco a 6h e un rapido calo (Figura 1G). A 6h, l'espressione nel gruppo LP ha raggiunto M = 19,220 (SD = 3,765; mediana = 18,950; forte upregulation), mentre nelle larve LK i livelli erano inferiori (M = 12,885; SD = 3,401; mediana = 11,590; forte upregulation). Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i trattamenti nei punti temporali analizzati. L'espressione di NADPH ossidasi 4-like ha mostrato profili temporali distinti tra i trattamenti (Figura 1H). Nelle larve LP si è osservato un aumento significativo da 3h (M = 1,148; SD = 0,329; mediana = 1,160; lieve upregulation) a 6h (M = 2,522; SD = 0,295; mediana = 2,480; forte upregulation) ($p < 0,05$), seguito da un ulteriore incremento fino al massimo a 18h (M = 3,700; SD = 1,156; mediana = 3,605). I livelli si sono poi leggermente ridotti ma sono rimasti elevati a 24h. Al contrario, nelle larve LK l'espressione ha raggiunto un picco anticipato a 6h (M = 3,962; SD = 1,102; mediana = 3,555; forte upregulation), dopo un incremento significativo rispetto a 3h (M = 2,350; SD = 0,626; mediana = 2,310) ($p < 0,05$). Dopo una lieve diminuzione a 12h (M = 3,365; SD = 1,082; mediana = 3,340), si è osservato un calo significativo tra 12h e 18h (M = 1,848; SD = 0,618; mediana = 1,555; lieve upregulation) ($p < 0,05$), seguito da un secondo incremento a 24h. Una differenza statisticamente significativa tra trattamenti è stata rilevata a 18h ($p < 0,01$), con valori più elevati nel gruppo LP, suggerendo un'attivazione più sostenuta nel tempo rispetto a LK. Il gene *Hem* ha mostrato tendenze simili nei due trattamenti, sebbene con differenze temporali (Figura 1I). Nel gruppo LK si è osservata un'attivazione precoce a 3h (M = 2,605; SD = 0,419; mediana = 2,740; forte upregulation), seguita da un declino graduale. Nelle larve LP l'espressione ha raggiunto un picco a 6h (M = 2,427; SD = 0,378; mediana = 2,380; forte upregulation) e poi è diminuita significativamente a 12h (M = 0,570; SD = 0,188; mediana = 0,500; lieve downregulation, $p < 0,01$), con fluttuazioni minori successivamente. Non sono emerse differenze significative tra i trattamenti. Infine, l'espressione di *IMPI* ha mostrato differenze sostanziali tra i due ceppi (Figura 1J). Nelle larve LP, è stata registrata un'elevata espressione precoce a 3h (M = 0,883; SD = 0,242; mediana =

0,835; lieve downregulation), seguita da una leggera diminuzione a 6h. Un secondo aumento è stato osservato a 12h ($M = 0,773$; $SD = 0,220$; mediana = 0,765; lieve downregulation), ma tra 12h e 18h si è verificato un calo marcato e significativo ($M = 0,065$; $SD = 0,015$; mediana = 0,065; forte downregulation, $p < 0,01$), che si è mantenuto fino a 24h. Al contrario, nelle larve LK l'espressione ha raggiunto un picco a 6h ($M = 1,722$; $SD = 0,506$; mediana = 1,645; lieve upregulation), seguito da una drastica riduzione a 12h ($M = 0,257$; $SD = 0,041$; mediana = 0,250; forte downregulation, $p < 0,01$). Successivamente si è osservato un aumento a 18h ($M = 1,013$; $SD = 0,305$; mediana = 1,040; lieve upregulation), prima di un nuovo calo significativo a 24h ($M = 0,092$; $SD = 0,028$; mediana = 0,090; forte downregulation, $p < 0,01$). Una differenza significativa tra trattamenti è stata riscontrata a 18h ($p < 0,01$), suggerendo una regolazione differenziale dell'espressione di IMPI da parte dei due ceppi probiotici. Nel complesso, il trattamento con LK sembra indurre una risposta di espressione più prolungata e variabile nel tempo, mentre LP determina un'attivazione più transiente.

Figura 1. Espressione relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dei geni analizzati in *Galleria mellonella*: (A) dorsal, (B) Rel, (C) cad, (D) 18w Rel, (E) spz4, (F) gallerimycin, (G) gloverin, (H) NADPH oxidase 4, (I) Hem, (J) IMPI, in seguito alla somministrazione di *Lactobacillus plantarum* (LP, pannelli di destra) e *Lactobacillus kefir* (LK, pannelli di sinistra), in cinque diversi tempi di analisi (3 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h). Le differenze statisticamente significative sono indicate solo tra punti temporali consecutivi all'interno dello stesso trattamento e tra trattamenti differenti (LP vs LK) allo stesso tempo di analisi ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). I dati anomali (outlier) sono indicati con punti rossi.



Analisi di correlazione di Spearman

Espressione genica tra i due trattamenti

L'analisi di correlazione temporale condotta sui livelli di espressione dei medesimi geni nei due trattamenti ha evidenziato sia analogie sia differenze nella modulazione temporale dell'espressione genica. I risultati, riassunti nella Tabella 3, mostrano che i geni *Dorsal*, *Rel*, *cad*, *spz4*, *gloverin* e *Hem* presentano coefficienti di correlazione positivi e statisticamente significativi, con valori di ρ (rho) compresi tra 0,812 e 0,969 ($p < 0,001$), indicando un andamento temporale dell'espressione simile tra LP e LK. Il gene *18w* mostra una correlazione moderata ($\rho = 0,692$; $p < 0,001$), mentre *gallerimycin* evidenzia una correlazione più debole ($\rho = 0,463$; $p < 0,001$), suggerendo una maggiore variabilità nella risposta degli AMPs (peptidi antimicrobici). Al contrario, non è stata osservata alcuna correlazione statisticamente significativa per *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = 0,201$; $p = 0,201$) e *IMPI* ($\rho = 0,088$; $p = 0,088$), indicando profili di espressione divergenti tra i due trattamenti probiotici.

Tabella 3. Coefficienti di correlazione di Spearman (ρ) utilizzati per valutare la similarità nei pattern temporali di espressione genica dei geni correlati alla risposta immunitaria tra i trattamenti LP e LK. Le correlazioni sono state considerate statisticamente significative per $p < 0,05$; i valori con $p \geq 0,05$ sono riportati come ns (non significativo). La forza della correlazione è stata interpretata come segue: assente ($\rho < 0,3$), debole ($0,3 \leq \rho < 0,5$), moderata ($0,5 \leq \rho < 0,7$) e forte ($\rho \geq 0,7$).

Gene	ρ (rho)	p-value	Correlazione
<i>Dorsal</i>	0.9693	<0.001	Forte
<i>Rel</i>	0.8888	<0.001	Forte
<i>cad</i>	0.9240	<0.001	Forte
<i>18w</i>	0.6917	<0.001	Moderata
<i>spz4</i>	0.8115	<0.001	Forte
<i>gallerimycin</i>	0.4633	<0.001	Debole
<i>gloverin</i>	0.8976	<0.001	Forte
<i>NADPH oxidase 4</i>	0.2010	Ns	Nessuna
<i>Hem</i>	0.8798	<0.001	Forte
<i>IMPI</i>	0.0880	Ns	Nessuna

Espressione genica all'interno di ciascun trattamento

L'analisi di correlazione di Spearman dei profili temporali di espressione genica (3-24 h, 5 punti temporali) ha rivelato pattern distinti di co-espressione tra geni correlati all'immunità nelle larve trattate con LP e LK (Figura 2).

***Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917**

La matrice di correlazione temporale dell'espressione genica di *G. mellonella* in seguito al trattamento con LP, comprendente sia associazioni positive sia negative, suggerisce risposte trascrizionali eterogenee (Figura 2A). Il gene *Dorsal* ha mostrato una correlazione positiva con *gallerimycin* ($\rho = 0,780$; $p < 0,001$) e correlazioni moderate con *Rel* ($\rho = 0,641$; $p < 0,001$) e *cad* ($\rho = 0,666$; $p < 0,001$), indicando un profilo di espressione temporale coerente sia con i regolatori immunitari a monte sia con gli effettori a valle. Al contrario, correlazioni deboli e non significative con *spz4*, *18w*, *gloverin*, *NADPH oxidase 4-like*, *Hem* e *IMPI* ($\rho < 0,27$; $p \geq 0,05$) potrebbero riflettere interazioni regolatorie indirette o asincrone. Il gene *Rel* è emerso come nodo centrale all'interno della rete temporale di co-espressione dei geni immuno-correlati, mostrando un ampio spettro di correlazioni statisticamente significative nell'intervallo 3-24h. Tra le associazioni positive, si sono osservate correlazioni forti con *IMPI* ($\rho = 0,828$; $p < 0,001$) e *cad* ($\rho = 0,817$; $p < 0,001$); correlazioni moderate con *Dorsal* ($\rho = 0,640$; $p < 0,001$), *gallerimycin* ($\rho = 0,599$; $p < 0,001$) e *gloverin* ($\rho = 0,577$; $p < 0,001$); e correlazioni più deboli ma significative con *18w* ($\rho = 0,492$; $p < 0,01$) e *Hem* ($\rho = 0,413$; $p < 0,05$). È stata inoltre identificata una correlazione negativa significativa con *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = -0,362$; $p < 0,05$). L'unica correlazione non significativa è risultata quella con *spz4* ($\rho = 0,171$). Il gene *cad* ha mostrato un profilo distinto di correlazioni temporali positive con numerosi geni immuno-correlati. Sono state osservate correlazioni forti e statisticamente significative con *Rel* ($\rho = 0,817$; $p < 0,001$) e *gloverin* ($\rho = 0,742$; $p < 0,001$); correlazioni moderate ma significative con *IMPI* ($\rho = 0,690$; $p < 0,001$), *Dorsal* ($\rho = 0,666$; $p < 0,001$) e *Hem* ($\rho = 0,554$; $p < 0,01$), indicando un pattern di attivazione coordinata nel periodo analizzato. Ulteriori correlazioni con *cad* sono risultate statisticamente significative ma di entità inferiore, incluse *gallerimycin* ($\rho = 0,488$; $p < 0,01$) e *spz4* ($\rho = 0,496$; $p < 0,01$). Le correlazioni con *18w* e *NADPH oxidase 4-like* non hanno raggiunto la significatività statistica ($p \geq 0,05$) e pertanto non sono riportate in Figura 2A. Il gene *18w* ha mostrato correlazioni positive moderate e statisticamente significative con *Rel* ($\rho = 0,492$; $p < 0,001$), *gallerimycin* ($\rho = 0,446$; $p < 0,05$) e *IMPI* ($\rho = 0,459$; $p < 0,05$). È stata inoltre osservata una correlazione negativa significativa con *spz4* ($\rho = -0,462$; $p < 0,05$). Il gene *spz4* ha evidenziato un pattern di correlazioni temporali distinto. Tra le associazioni statisticamente significative, si sono osservate forti correlazioni positive con *gloverin* ($\rho = 0,800$; $p < 0,001$) e *Hem* ($\rho = 0,756$; $p < 0,001$). Al contrario, sono state riscontrate correlazioni negative con *18w* ($\rho = -0,462$; $p < 0,05$) e *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = -0,414$; $p < 0,05$). Le altre correlazioni non hanno raggiunto

la significatività statistica. L'analisi di correlazione ha inoltre evidenziato associazioni positive tra gallerimycin e diversi geni immuno-correlati nell'intervallo 3-24h. La correlazione più e significativa è stata osservata con *Dorsal* ($\rho = 0,780$; $p < 0,001$), seguita da una correlazione moderata con *Rel* ($\rho = 0,599$; $p < 0,001$) e da correlazioni più deboli ma significative con *cad* ($\rho = 0,495$; $p < 0,01$) e *18w* ($\rho = 0,446$; $p < 0,05$). Altre correlazioni non risultavano statisticamente significative, comprese le associazioni deboli con *Hem* ($\rho = 0,265$), *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = 0,244$), *IMPI* ($\rho = 0,241$) e *gloverin* ($\rho = 0,160$), nonché una correlazione negativa non significativa con *spz4* ($\rho = -0,061$). Il gene *gloverin* ha mostrato uno dei profili di correlazione temporale più marcati nell'intervallo 3-24h, con associazioni costanti e statisticamente significative. Sono state osservate forti correlazioni positive con *Hem* ($\rho = 0,805$; $p < 0,001$), *spz4* ($\rho = 0,800$; $p < 0,001$) e *cad* ($\rho = 0,742$; $p < 0,001$), seguite da correlazioni moderate con *IMPI* ($\rho = 0,656$; $p < 0,001$) e *Rel* ($\rho = 0,576$; $p < 0,001$). È stata inoltre rilevata una correlazione negativa significativa con *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = -0,515$; $p < 0,01$). Il gene *NADPH oxidase 4-like* ha mostrato un pattern di correlazioni temporali negative con diversi geni immuno-correlati nell'intervallo 3-24h. Sono state osservate associazioni inverse significative con *gloverin* ($\rho = -0,515$; $p < 0,01$), *IMPI* ($\rho = -0,513$; $p < 0,01$), *Hem* ($\rho = -0,471$; $p < 0,01$), *spz4* ($\rho = -0,414$; $p < 0,05$) e *Rel* ($\rho = -0,362$; $p < 0,05$). Il gene *Hem* ha mostrato un pattern definito di correlazioni di espressione genica temporale nel periodo 3-24h, con numerose associazioni statisticamente significative con geni immuno-correlati. Sono state osservate forti correlazioni positive con *gloverin* ($\rho = 0,805$; $p < 0,001$) e *spz4* ($\rho = 0,756$; $p < 0,001$), seguite da correlazioni moderate con *cad* ($\rho = 0,553$; $p < 0,01$) e più deboli con *Rel* ($\rho = 0,413$; $p < 0,05$) e *IMPI* ($\rho = 0,374$; $p < 0,05$). È stata anche rilevata una correlazione negativa significativa con *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = -0,471$; $p < 0,01$). Altre correlazioni non significative includevano deboli associazioni con *gallerimycin* ($\rho = 0,265$, ns), *Dorsal* ($\rho = 0,214$, ns) e *18w* ($\rho = -0,257$, ns). Secondo la matrice di correlazione, *IMPI* ha mostrato correlazioni positive e statisticamente significative con *Rel* ($\rho = 0,828$; $p < 0,001$), *cad* ($\rho = 0,690$; $p < 0,001$) e *gloverin* ($\rho = 0,656$; $p < 0,001$), oltre a correlazioni più deboli ma significative con *18w* ($\rho = 0,459$; $p < 0,05$) e *Hem* ($\rho = 0,374$; $p < 0,05$). È stata inoltre osservata una correlazione negativa significativa con *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = -0,513$; $p < 0,01$), indicativa di un pattern di espressione temporale inverso tra questi geni.

***Lactobacillus kefir* DSM 10551**

Nelle larve trattate con LK (Figura 2B), Dorsal ha mostrato correlazioni temporali positive e statisticamente significative con diversi geni correlati alla risposta immunitaria. In particolare, sono state osservate associazioni significative con *cad* ($\rho = 0,689$; $p < 0,001$), *gallerimycin* ($\rho = 0,668$; $p < 0,001$), *Rel* ($\rho = 0,526$; $p < 0,01$) e una correlazione più debole ma comunque significativa con *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = 0,394$; $p < 0,05$). Le restanti correlazioni, pur essendo positive, non hanno raggiunto la significatività statistica. Questi risultati evidenziano *Rel* come componente centrale nel coordinamento trascrizionale della risposta immunitaria indotta da LK. Tra le correlazioni non significative si annoverano deboli associazioni positive con *spz4* ($\rho = 0,202$; ns) e *Hem* ($\rho = 0,263$; ns), oltre a una debole correlazione negativa con *IMPI* ($\rho = -0,046$; ns). Il gene *cad* ha mostrato un pattern ampio e coerente di correlazioni temporali positive e statisticamente significative con la maggior parte dei geni immuno-correlati nell'intervallo 3-24h. È risultato significativamente correlato con *Rel* ($\rho = 0,763$; $p < 0,001$), *gloverin* ($\rho = 0,718$; $p < 0,001$), *Dorsal* ($\rho = 0,689$; $p < 0,001$), *gallerimycin* ($\rho = 0,527$; $p < 0,01$), *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = 0,501$; $p < 0,01$), *spz4* ($\rho = 0,485$; $p < 0,01$), *Hem* ($\rho = 0,429$; $p < 0,05$) e *IMPI* ($\rho = 0,384$; $p < 0,05$), indicando un elevato grado di sincronizzazione temporale nei pattern di espressione genica. L'unica eccezione è rappresentata da *18w* ($\rho = 0,357$; ns), che mostra una correlazione positiva ma non significativa, suggerendo una risposta trascrizionale più tardiva o divergente. Il gene *18w* ha mostrato una co-espressione selettiva e statisticamente significativa con un numero limitato di geni immuno-correlati. Sono state osservate correlazioni positive moderate con *Rel* ($\rho = 0,610$; $p < 0,001$) e più deboli ma significative con *gloverin* ($\rho = 0,423$; $p < 0,05$) e *Hem* ($\rho = 0,456$; $p < 0,05$). Al contrario, non sono state riscontrate correlazioni statisticamente significative con *cad* ($\rho = 0,357$; ns), *Dorsal* ($\rho = 0,180$; ns), *spz4* ($\rho = 0,144$; ns), *gallerimycin* ($\rho = 0,273$; ns), *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = -0,009$; ns) e *IMPI* ($\rho = -0,001$; ns), indicando un coinvolgimento più periferico o asincrono di *18w* rispetto a questi geni nel corso della risposta trascrizionale. Il gene *spz4* è stato caratterizzato da un pattern coerente di correlazioni temporali positive e statisticamente significative con diversi geni associati all'immunità. Tra questi figurano *gloverin* ($\rho = 0,777$; $p < 0,001$), *Hem* ($\rho = 0,743$; $p < 0,001$), *IMPI* ($\rho = 0,688$; $p < 0,001$) e *cad* ($\rho = 0,485$; $p < 0,01$). Per *Rel*, è stata rilevata una correlazione temporale positiva con *cad* ($\rho = 0,763$; $p < 0,001$). Ulteriori associazioni moderate sono state osservate con *18w* ($\rho = 0,610$; $p < 0,001$), *gloverin* ($\rho = 0,603$; $p < 0,001$), *Dorsal* ($\rho = 0,526$; $p < 0,01$), *gallerimycin* ($\rho = 0,529$; $p < 0,01$) e *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = 0,483$; $p < 0,01$). Il gene *gallerimycin* ha mostrato un

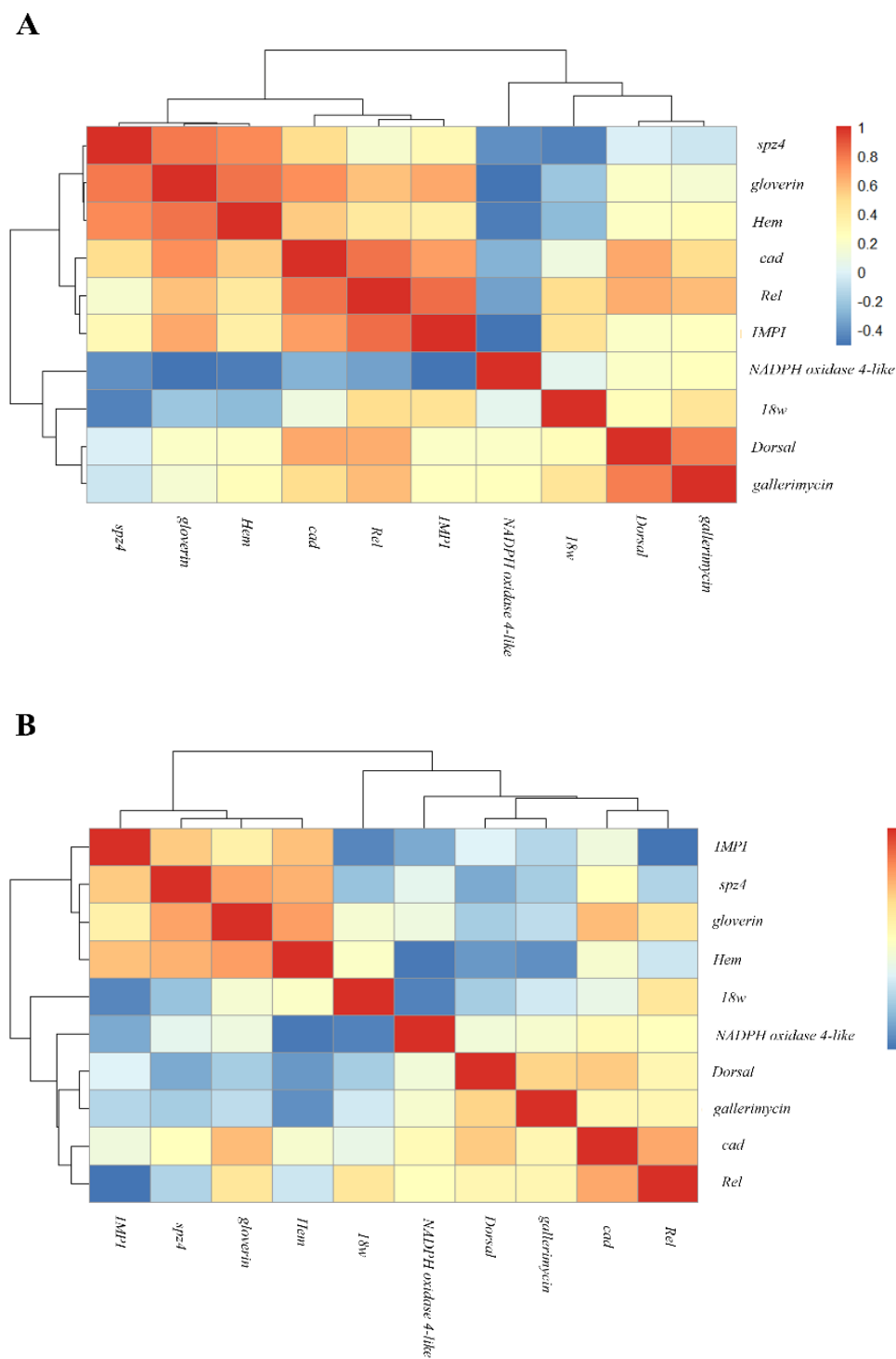
profilo trascrizionale caratterizzato da correlazioni temporali positive con *Dorsal* ($\rho = 0,668$; $p < 0,001$), *cad* ($\rho = 0,527$; $p < 0,01$), *Rel* ($\rho = 0,529$; $p < 0,01$) e *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = 0,432$; $p < 0,05$). Altre correlazioni positive sono state osservate, ma non hanno raggiunto la significatività statistica. Il gene *gloverin* è emerso come componente centrale di un cluster di geni immunitari co-espressi, mostrando correlazioni temporali positive e statisticamente significative con sette geni: *Hem* ($\rho = 0,785$; $p < 0,001$), *spz4* ($\rho = 0,777$; $p < 0,001$), *cad* ($\rho = 0,718$; $p < 0,001$), *Rel* ($\rho = 0,603$; $p < 0,001$), *IMPI* ($\rho = 0,559$; $p < 0,01$), *18w* ($\rho = 0,423$; $p < 0,05$) e *NADPH oxidase 4-like* ($\rho = 0,378$; $p < 0,05$). Questa ampia rete di associazioni colloca *gloverin* all'interfaccia tra elementi regolatori e geni effettrici, confermandone il ruolo chiave nella risposta antimicrobica. Al contrario, le correlazioni con *dorsal* ($\rho = 0,184$; ns) e *gallerimycin* ($\rho = 0,232$; ns) non sono risultate statisticamente significative, pur mostrando una tendenza positiva. Il gene *NADPH oxidase 4-like* ha mostrato un pattern di espressione moderatamente coordinato, con correlazioni temporali positive e statisticamente significative con diversi geni immuno-correlati. Associazioni rilevanti sono state osservate con *cad* ($\rho = 0,501$; $p < 0,01$), *Rel* ($\rho = 0,483$; $p < 0,01$), *gallerimycin* ($\rho = 0,432$; $p < 0,05$), *Dorsal* ($\rho = 0,394$; $p < 0,05$) e *gloverin* ($\rho = 0,378$; $p < 0,05$). Il gene *Hem* ha mostrato forti correlazioni temporali positive con *spz4* ($\rho = 0,743$; $p < 0,001$), *gloverin* ($\rho = 0,785$; $p < 0,001$) e *IMPI* ($\rho = 0,716$; $p < 0,001$). Correlazioni moderate sono state inoltre registrate con *cad* ($\rho = 0,429$; $p < 0,05$) e *18w* ($\rho = 0,456$; $p < 0,05$). Infine, *IMPI* ha mostrato correlazioni temporali positive e statisticamente significative con quattro geni immuno-correlati: *Hem* ($\rho = 0,716$; $p < 0,001$), *spz4* ($\rho = 0,688$; $p < 0,001$), *gloverin* ($\rho = 0,559$; $p < 0,01$) e *cad* ($\rho = 0,384$; $p < 0,05$). Tutte le altre associazioni non riportate non risultavano statisticamente significative ($p > 0,05$).

Analisi di clustering gerarchico in seguito alla somministrazione di Lactobacillus

L'analisi di clustering gerarchico dell'espressione dei geni immuno-correlati in seguito ai trattamenti con LP e LK ha rivelato moduli temporalmente coordinati di geni co-espressi (Figura 3). Le heatmap risultanti hanno permesso di identificare pattern trascrizionali distinti, che riflettono raggruppamenti funzionali e regolazione dinamica nei diversi punti temporali sperimentali (3-24 ore). Nel gruppo trattato con LP (Figura 3A) sono stati identificati due principali cluster di co-espressione genica, ciascuno ulteriormente suddiviso in sottogruppi funzionalmente e temporalmente coerenti. Il primo cluster includeva un sottogruppo composto da *spz4*, *gloverin* e *Hem*, strettamente associati e caratterizzati da alti coefficienti di correlazione (*spz4-gloverin*, $\rho = 0,800$; $p < 0,001$; *gloverin-Hem*, $\rho = 0,805$; $p < 0,001$; *spz4-*

Hem, $\rho = 0,756$; $p < 0,001$). Un secondo sottogruppo, all'interno dello stesso cluster, comprendeva cad, Rel e IMPI, che mostravano forti correlazioni reciproche (cad-Rel, $\rho = 0,817$; $p < 0,001$; Rel-IMPI, $\rho = 0,828$; $p < 0,001$; cad-IMPI, $\rho = 0,690$; $p < 0,001$). Il secondo cluster principale includeva 18w, Dorsal e gallerimycin, che presentavano correlazioni moderate (Dorsal-gallerimycin, $\rho = 0,780$; $p < 0,001$; 18w-gallerimycin, $\rho = 0,446$; $p < 0,05$). All'interno di questo cluster, Dorsal e gallerimycin formavano un sottogruppo strettamente connesso, mentre 18w si ramificava separatamente, collegandosi più debolmente a questa coppia centrale. Di particolare rilievo è NADPH oxidase 4-like, che, pur raggruppandosi nel secondo cluster, mostrava correlazioni deboli o inverse con molti geni del primo cluster (es. NADPH oxidase 4-like-gloverin, $\rho = -0,515$; $p < 0,01$; NADPH oxidase 4-like-IMPI, $\rho = -0,514$; $p < 0,01$), indicando un profilo trascrizionale distinto rispetto agli altri geni analizzati. Nel trattamento con LK (Figura 3B) sono stati identificati due principali cluster di co-espressione genica. Il primo cluster includeva spz4, gloverin e Hem, raggruppati allo stesso livello gerarchico e formanti un modulo trascrizionalmente coeso con elevati coefficienti di correlazione (spz4-gloverin, $\rho = 0,777$; $p < 0,001$; spz4-Hem, $\rho = 0,743$; $p < 0,001$; gloverin-Hem, $\rho = 0,785$; $p < 0,001$). IMPI era associato a questo modulo tramite un ramo connettivo e mostrava correlazioni positive con ciascuno dei tre geni (IMPI-Hem, $\rho = 0,716$; $p < 0,001$; IMPI-spz4, $\rho = 0,689$; $p < 0,001$; IMPI-gloverin, $\rho = 0,559$; $p < 0,01$). Il secondo cluster era organizzato in due sottogruppi principali: il primo costituito da cad e Rel, mente correlati (cad-Rel, $\rho = 0,763$; $p < 0,001$); il secondo comprendente *dorsal* e *gallerimycin*, con correlazione moderata (*dorsal-gallerimycin*, $\rho = 0,668$; $p < 0,001$). Questi sottogruppi erano connessi da un ramo comune, formando una struttura compatta all'interno del cluster. NADPH oxidase 4-like risultava collegato a questo modulo centrale tramite un ramo separato. Infine, 18w era posizionato su un ramo indipendente, mostrando correlazioni più deboli con gli altri membri del cluster.

Figura 3. Mappa di calore del clustering gerarchico dei coefficienti di correlazione di Spearman tra geni correlati alla risposta immunitaria in seguito ai trattamenti probiotici. I pannelli (A) e (B) mostrano le correlazioni gene-gene nelle larve di *Galleria mellonella* trattate rispettivamente con *Lactobacillus plantarum* (LP) e *Lactobacillus kefir* (LK), in cinque diversi tempi di analisi (3-24 ore post-trattamento). La heatmap illustra la forza e la direzione delle correlazioni (ρ) mediante una scala cromatica che varia dal rosso (correlazione positiva forte) al blu (correlazione negativa forte).



Discussione

Il presente studio fornisce solide evidenze a sostegno dell'utilizzo di *G. mellonella* come valido modello *in vivo* per l'indagine delle interazioni ospite-probiotico, in particolare nel contesto delle risposte immunitarie innate. L'analisi dell'espressione temporale di geni chiave correlati all'immunità, successiva alla somministrazione di LP e LK, ha permesso di identificare pattern immunomodulatori distinti e specifici di ceppo. I due probiotici hanno infatti indotto dinamiche differenziali nei tempi e nell'ampiezza dell'attivazione genica, evidenziando l'utilità di questo modello per lo screening preclinico dell'attività immunomodulatoria dei probiotici. La proteina di polarità embrionale *dorsal* di *G. mellonella* mostra un'elevata corrispondenza con il fattore di trascrizione umano p65 isoforma 1, un regolatore canonico della segnalazione infiammatoria. I parametri di allineamento indicano una relazione statisticamente significativa, con un livello intermedio di identità di sequenza che supporta la conservazione strutturale. La copertura relativamente bassa suggerisce che l'omologia sia limitata a specifiche regioni funzionali, piuttosto che estendersi all'intera sequenza. L'allineamento comprende infatti il dominio conservato NF- κ B/Rel/Dorsal (Baeuerle, 1991), nonché regioni strutturalmente preservate come il dominio RHD-n_RelA e la superfamiglia dei fattori di trascrizione simili a p53 (Wolfe et al., 1997), evidenziando la conservazione funzionale dei domini deputati al legame con il DNA, alla dimerizzazione e all'attivazione trascrizionale, elementi centrali nella regolazione immunitaria (Tabella supplementare 1). In *G. mellonella*, come in *D. melanogaster*, *dorsal* svolge un ruolo fondamentale nell'attivazione dei peptidi antimicrobici (AMPs) a valle della via di segnalazione Toll, la quale viene principalmente attivata in risposta a infezioni fungine o batteriche Gram-positive (Sheehan and Kavanagh, 2017)(Sheehan & Kavanagh, 2017). Tale attivazione ha inizio con la scissione proteolitica della proteina Spätzle 4 (*spz4*), che in seguito si lega a recettori Toll-like, tra cui *Toll* canonico e *18-wheeler* (*18w*), innescando una cascata intracellulare altamente conservata (Jiang et al., 2004). Nell'uomo, il fattore di trascrizione p65 rappresenta un attivatore trascrizionale centrale delle citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF- α , IL-1 β e IL-6, e svolge un ruolo cruciale nella risposta all'infezione, nell'attivazione delle cellule immunitarie e nella risoluzione dei processi infiammatori (Tak and Firestein, 2001). La sua attività è regolata da fosforilazione, ubiquitinazione e acetilazione; quest'ultima è modulata da SIRT1, che deacetila p65 inibendone l'attività e controllando l'esacerbazione dell'infiammazione, aprendo così prospettive terapeutiche in patologie come diabete, aterosclerosi e cancro (Sharma et al., 2025). Inoltre, NF- κ B p65 è essenziale per mantenere la responsività dei monociti, poiché le piastrine rappresentano un serbatoio fondamentale di

questa proteina nel sangue umano, prevenendo la cosiddetta immunoparalisi monocitaria (Hawwari et al., 2024). Da una prospettiva traslazionale, la modulazione del fattore di trascrizione umano p65 da parte di *L. plantarum* e *L. kefir* rafforza il legame funzionale tra i sistemi immunitari degli insetti e dell'uomo. Diversi ceppi di *L. plantarum* (ad esempio L15, ELF051) hanno dimostrato di sopprimere l'attivazione di NF- κ B mediante la down-regolazione dell'asse TLR4/MyD88, riducendo l'espressione di citochine pro-infiammatorie in modelli murini di colite e di diarrea associata ad antibiotici (Yu et al., 2020; Liang et al., 2023). Tali effetti sono associati al ripristino della composizione del microbiota intestinale e alla soppressione di IL-1 β e TNF- α . Inoltre, *L. plantarum* LLY-606 attenua la neuroinfiammazione nei topi anziani tramite inibizione di NF- κ B, suggerendo una capacità immunomodulatoria sistemica (Shi et al., 2024). Sebbene gli studi su *L. kefir* siano meno numerosi, le evidenze disponibili confermano effetti regolatori analoghi sul sistema immunitario dell'ospite, promuovendo l'espressione di IL-10 e riducendo l'infiammazione mediata da NF- κ B sia a livello intestinale sia sistemico (Carasi et al., 2015). In linea con tali osservazioni, l'espressione del gene *dorsal* nei diversi tempi sperimentali ha rivelato differenze significative sia nella tempistica sia nell'intensità dell'attivazione trascrizionale (Figura 1A). Dorsal ha mostrato una sovraregolazione transitoria, con un picco a 12 ore dal trattamento in entrambi i gruppi probiotici. Sebbene non siano state riscontrate differenze statisticamente significative tra i trattamenti LP e LK nei singoli punti temporali, LP ha costantemente indotto livelli di espressione assoluti più elevati, indicando un coinvolgimento più marcato delle risposte immunitarie mediate dalla via Toll. Ciò potrebbe riflettere differenze nel riconoscimento dei pattern molecolari associati ai microrganismi (MAMPs) o diverse capacità di *immune priming* tra i due ceppi (Sheehan et al., 2018, 2020). Il fattore nucleare NF- κ B subunità p110 isoforma X1 di *G. mellonella* costituisce un componente centrale della via di segnalazione IMD, classicamente attivata dai batteri Gram-negativi attraverso il riconoscimento del peptidoglicano di tipo acido diaminopimelico (DAP) (Sarvari et al., 2020). Sebbene tradizionalmente associata alla difesa contro batteri Gram-negativi, secondo Hedengren-Olcott l'induzione di AMPs in *D. melanogaster* da parte di *Micrococcus luteus* richiede la proteina *relish* (Hedengren-Olcott et al., 2004). Ciò suggerisce che questa proteina integri segnali immunitari provenienti sia da sfide Gram-negative sia Gram-positive, probabilmente a causa di uno spettro di riconoscimento più ampio dei recettori a monte o di una convergenza funzionale con le vie di segnalazione Toll. Oltre a regolare la trascrizione dei peptidi antimicrobici, inclusa *gloverin*, essa partecipa anche alla modulazione dei geni correlati all'autofagia (ATGs), collegando così le risposte immunitarie umorali e intracellulari, in particolare nel contesto delle infezioni intracellulari

(Kazek et al., 2019). La subunità p110 di NF- κ B in *G. mellonella* mostra un'elevata omologia con la subunità p100 di NF- κ B umano (isoforma A), con un alto punteggio *Bit* e un valore *E* fortemente significativo. Questi risultati indicano che, nonostante un'identità complessiva moderata, le due proteine condividono una relazione evolutiva e conservano caratteristiche tipiche della segnalazione non canonica di NF- κ B (Tabella supplementare 1). Tale relazione è confermata dalla conservazione di diversi domini chiave di NF- κ B: il Rel Homology Domain, responsabile del legame al DNA e della dimerizzazione; il RHD-n_NF κ B2, corrispondente alla regione N-terminale di NF- κ B2 coinvolta nel processamento del precursore e nell'interazione con il DNA (Moorthy et al., 2007); e il dominio IPT_NF κ B, una struttura a pieghe β -sandwich che stabilizza la formazione del dimero (Li and Stark, 2002). Inoltre, la proteina p110 presenta una struttura simile a quella dei fattori di trascrizione p53-like, fornendo evidenze di ruoli ulteriori rispetto all'immunità canonica, come la possibile partecipazione a processi di apoptosi, riparazione del DNA e risposta allo stress cellulare (Stroud et al., 2002). Questo parallelismo strutturale e funzionale assume rilievo traslazionale alla luce delle recenti evidenze riguardanti la modulazione di NF- κ B da parte di *L. plantarum*. Nei modelli murini, *L. plantarum* LLY-606 attenua l'infiammazione indotta da iperuricemia inibendo l'asse TLR4/MyD88/NF- κ B, riducendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie e modulando la composizione del microbiota intestinale (Shi et al., 2023). Analogamente, il ceppo L15 esercita effetti anti-infiammatori nella colite mediante soppressione dell'attivazione di NF- κ B indotta da LPS e riduzione dei livelli di IL-6 e TNF- α (Yu et al., 2020). In un modello murino di malattia di Parkinson, il ceppo DP189 inibisce le vie di segnalazione NLRP3 e NF- κ B, riducendo la neuroinfiammazione e influenzando l'asse intestino-cervello (Wang et al., 2022). Inoltre, *L. plantarum* protegge contro l'infiammazione intestinale indotta da *E. coli* enterotossigenico, inibendo le cascate citochiniche mediate da NF- κ B e migliorando l'integrità della barriera epiteliale (Han et al., 2021). Il profilo di espressione del gene Rel ha mostrato un chiaro picco di attivazione trascrizionale a 12 ore dalla somministrazione dei probiotici, con una risposta marcatamente più elevata indotta da LP rispetto a LK (Figura 1B). Tale sovraregolazione pronunciata suggerisce che LP possa attivare simultaneamente le vie di segnalazione Toll e IMD, generando una risposta immunitaria innata coordinata e bilaterale in *G. mellonella* - fenomeno già descritto anche in *Drosophila* (De Gregorio et al., 2002) (Figura 1B). La proteina homeobox CDX-2 isoforma X2 in *G. mellonella* mostra un elevato grado di conservazione con il suo ortologo umano CDX-2 isoforma 1, come indicato da un punteggio *Bit* di 137. L'alta identità di sequenza nelle regioni allineate, nonostante una copertura parziale, evidenzia la presenza di domini altamente conservati. Questi risultati confermano la conservazione

funzionale del dominio homeodomain, che media l'interazione sito-specifica con il DNA nei promotori genici coinvolti nell'identità epiteliale e nella regolazione immunitaria. La regione acida N-terminale, anch'essa conservata, contribuisce verosimilmente al reclutamento di co-attivatori e all'attivazione trascrizionale (Mannervik, 1999) (Tabella supplementare 1). Il gene *cad* è stato proposto come regolatore negativo della via IMD, poiché la sua silenziazione comporta un'aumentata espressione di peptidi antimicrobici (AMPs), suggerendo un ruolo nel mantenimento dell'equilibrio immunitario e nella prevenzione dell'attivazione infiammatoria cronica (Sarvari et al., 2020). Negli esseri umani, CDX2 è un fattore di trascrizione chiave coinvolto nella differenziazione epiteliale, nella riparazione dei tessuti e nella modulazione immunitaria. La sua regolazione è strettamente legata a meccanismi anti-infiammatori, e la sua disfunzione è stata associata a disturbi infiammatori e metaplastici (Sun, 2017; Lu et al., 2020). Diversi studi indicano che *L. plantarum* può modulare vie che convergono sulla differenziazione epiteliale e sulla riparazione dei tessuti. *L. plantarum* 124 aumenta l'abbondanza di taxa benefici come *Bifidobacterium* e *Dubosiella*, entrambi associati alla regolazione omeostatica delle risposte epiteliali (Li et al., 2023). Inoltre, PS128 promuove la segnalazione della serotonina e la produzione di mucina (Chen et al., 2021). Dopo la somministrazione del probiotico, *cad* ha mostrato un profilo di espressione simile in entrambi i gruppi trattati con LP e LK, con un picco precoce a 6 ore, prolungato fino a 12 ore. Tuttavia, i livelli di espressione sono stati costantemente più alti nei larve trattate con LP, suggerendo un'attivazione più robusta precoce della segnalazione immunitaria (Figura 1C). Il recettore Toll-like 7 in *G. mellonella* è una proteina transmembrana correlata a Toll caratterizzata da molteplici domini leucina-rich repeat (LRR), un tratto distintivo delle molecole coinvolte nella sorveglianza immunitaria innata. Questi domini formano una struttura a solenoide curva ottimizzata per interazioni proteina-proteina, cruciali per il riconoscimento del ligando, la specificità della segnalazione e la stabilità del recettore. Il core centrale LRR è condiviso tra molti recettori di riconoscimento dei pattern (PRR), inclusi Toll-like e proteine della famiglia SLIT, sottolineando un'architettura immunitaria conservata (Ng and Xavier, 2011) (Tabella supplementare 1). In *D. melanogaster*, Toll-like receptor 7 è essenziale per il corretto sviluppo del corpo grasso, e la sua assenza nei larve mutanti comporta un'induzione compromessa di un'ampia gamma di geni di peptidi antimicrobici, non limitata a quelli diretti contro batteri Gram-negativi (Williams et al., 1997; Ligoxygakis et al., 2002), suggerendo una conservazione funzionale in *G. mellonella*. La combinazione di elevata copertura con bassa identità di sequenza suggerisce una somiglianza strutturale più distante, probabilmente limitata ai motivi LRR conservati piuttosto che a un'equivalenza funzionale complessiva (Tabella supplementare

1). Interessante, l'analisi BLAST della proteina ha comunque identificato la proteina umana SLIT1, funzionalmente implicata in processi immunitari, come il migliore corrispondente. Slit homolog 1 è una proteina mammifera appartenente alla famiglia Slit, coinvolta in diverse funzioni chiave sia in processi fisiologici sia patologici tramite interazioni con i recettori Robo. Inizialmente caratterizzata nel sistema nervoso per il suo ruolo nella guida degli assoni, la segnalazione Slit/Robo è stata successivamente implicata in una gamma più ampia di attività biologiche, inclusi angiogenesi, regolazione della migrazione delle cellule immunitarie e promozione dell'invasione e metastasi delle cellule tumorali (Tong et al., 2019). L'analisi dei domini conservati ha rivelato la presenza della superfamiglia LRR (Tabella supplementare 1). Questa superfamiglia è caratterizzata dalla presenza di domini LRR che formano una struttura β - α superelicoideale destrorsa, simile a quella osservata nella proteina batterica di invasione internalin (Wollert et al., 2007). Nella nostra analisi temporale, 18w ha mostrato un profilo trascrizionale bifasico in entrambi i gruppi, con un'induzione iniziale a 3 h, un declino a 6 h e una successiva ripresa a 12 h, sebbene i livelli di espressione siano rimasti al di sotto della linea di base durante tutto il periodo di osservazione, indicando una downregulation. I larve trattati con LP hanno mostrato valori relativamente più alti, in particolare a 18 h, coerenti con una risposta mediata dal recettore più pronunciata, sebbene sub-soglia (Figura 1D). Le proteine spaetzle 4, *gallerimycin* e gloverin rappresentano componenti chiave e specializzati del sistema immunitario innato in *G. mellonella*, ciascuno con funzioni distinte e altamente integrate. Negli insetti, le proteine spaetzle agiscono come ligandi simili a citochine che, una volta attivate proteoliticamente, iniziano la segnalazione della via Toll legandosi a recettori specifici. Sebbene strutturalmente non correlate alle citochine dei vertebrati (Tabella supplementare 1), svolgono un ruolo funzionalmente analogo agendo come segnali di pericolo che attivano la produzione di AMP attraverso le cascate trascrizionali mediate da Toll (Moghaddam et al., 2016; Yamamoto-Hino and Goto, 2016). Entrambi i gruppi probiotici hanno mostrato un picco marcato nell'espressione di spz4 a 6 h, seguito da un rapido declino, con LP che ha mostrato valori costantemente più alti. Sebbene questi livelli siano successivamente scesi al di sotto della linea di base, il trend complessivo suggerisce un'attivazione trascrizionale quantitativamente più forte ma transitoria sotto trattamento LP, nonostante la predominanza di ipo-espressione nei tempi successivi (Figura 1E). A valle di questa via, *gallerimycin* è un AMP simile a una defensina ricca di cisteina con potente attività antifungina e specificità contro batteri Gram-positivi (Schuhmann et al., 2003). Notevolmente, contiene un motivo simile al lipobox (Tabella supplementare 1), tipicamente coinvolto nella lipidazione delle lipoproteine batteriche e nell'ancoraggio alla membrana, che può migliorarne la localizzazione o la stabilità immunitaria.

Sebbene la lipidazione diretta negli insetti rimanga speculativa, il motivo potrebbe conferire resistenza alle proteasi o facilitare interazioni con altri AMP (Kovacs-Simon et al., 2011). La trascrizione di *gallerimycin* ha raggiunto il picco a 12 h in entrambi i gruppi, con un'induzione significativamente più forte nei larve trattati con LP, indicando una conversione efficiente della segnalazione upstream in output effettore (Figura 1F). In *G. mellonella*, *gloverin* mostra un profilo di risposta più ampio, essendo indotta non solo da batteri Gram-negativi ma anche da Gram-positivi e funghi, suggerendo un ruolo flessibile e contestuale nella difesa immunitaria (Serrano et al., 2023). Sebbene manchi di domini omologhi negli esseri umani (Tabella supplementare 1), *gloverin* mostra una forte somiglianza funzionale con le catelicidine dei vertebrati, come LL-37, in particolare nella capacità di destabilizzare le membrane microbiche e influenzare le risposte immunitarie (Wang, 2014). La sua induzione precoce e robusta, soprattutto nel gruppo LP, sottolinea il suo ruolo come effettore principale nell'immunità sistemica (Vogel et al., 2011) (Figura 1G). Nonostante una percentuale di identità moderata, la proteina NADPH ossidasi 4-like isoform X1 in *G. mellonella* mostra un'ampia copertura e un E-value molto basso con il corrispondente umano, NADPH ossidasi 4 isoform, suggerendo una forte conservazione dei domini funzionali principali, in particolare le regioni catalitiche NADPH ossidasi (Tabella supplementare 1). Ciò supporta la rilevanza funzionale dell'omologo di *G. mellonella* nelle risposte immunitarie ossidative. Negli esseri umani, NADPH ossidasi 4 è un enzima chiave nella produzione di ROS e nell'immunità innata mediata dal redox. La sua architettura di domini include un fold a β -barile simile alla riboflavina sintasi, che contribuisce a stabilizzare i siti redox attivi essenziali per il ciclo catalitico (Tabella supplementare 1). Queste caratteristiche supportano l'ipotesi che l'isoforma NOX4-like di *G. mellonella* mantenga la complessità meccanica necessaria per la difesa microbica mediata da ROS, coerente con il ruolo funzionale proposto. In *G. mellonella*, come in altri insetti, le NADPH ossidasi giocano un ruolo centrale nell'uccisione microbica mediata dagli emociti durante la fagocitosi, dove il burst ossidativo è cruciale. Specificamente, è stato dimostrato che gli emociti producono superossido durante la fagocitosi, e la sua inibizione da parte del cloruro di diphenileneiodonio annulla l'uccisione microbica, dimostrando l'attività funzionale di NOX (Bergin et al., 2005). Nei mammiferi, la NADPH ossidasi 4 (NOX4) è espressa costitutivamente nelle cellule immunitarie ed epiteliali, contribuendo sia alla difesa dell'ospite sia ai percorsi di segnalazione sensibili al redox, quali NF- κ B, MAPK e JNK, processi implicati in infiammazione, fibrosi e patologie metaboliche. Il suo principale prodotto, H₂O₂, agisce come secondo messaggero diffusibile in tali vie (Gan et al., 2021). Sebbene non siano stati valutati interazioni dirette con NOX4, è stato dimostrato che *L. plantarum* può modulare l'equilibrio

redox nei modelli mammiferi. Ad esempio, il ceppo HFY09 aumenta l'attività degli enzimi antiossidanti epatici, riduce le citochine infiammatorie nei modelli di danno epatico alcolico (Gan et al., 2021) e ripristina l'omeostasi redox nella NASH (Kim et al., 2023) tramite modulazione indiretta di percorsi dipendenti da NOX. Ulteriori dati indicano che *L. plantarum* migliora l'integrità mitocondriale e riduce la perossidazione lipidica, entrambi processi collegati alla regolazione della NADPH ossidasi. Le evidenze relative alla modulazione redox da parte di *L. kefir* sono meno estese; tuttavia, il ceppo CIDCA 8348 ha ridotto la secrezione di TNF α , IL-6 e IL-13, aumentando IL-10 e le cellule T regolatorie in cellule derivanti da pazienti con IBD, cambiamenti coerenti con un'immunoregolazione sensibile al redox (Curciarello et al., 2021). Nel nostro modello, l'espressione di NADPH ossidasi 4-like ha mostrato un pattern dipendente dal ceppo: LP ha indotto un incremento progressivo con picco a 18 h, mentre LK ha determinato un picco più precoce ma meno sostenuto a 6 h. L'induzione prolungata da parte di LP suggerisce un'attivazione estesa delle difese ROS-dipendenti (Figura 1H). La proteina associata alla membrana Hem in *G. mellonella* mostra un'elevata conservazione evolutiva con l'isoforma 1 della proteina associata a Nck umana, con un allineamento che copre quasi l'intera sequenza di entrambe le proteine, supportando l'ipotesi di conservazione funzionale. Sebbene non siano annotati sotto-domini Pfam o SMART, l'analisi InterPro collega Hem al complesso regolatorio WAVE, coinvolto nella polimerizzazione dell'actina dipendente da Rac1 e nel rimodellamento del citoscheletro durante la fagocitosi (Chen et al., 2014) (Tabella Supplementare 1). Negli insetti, Hem è espresso prevalentemente negli emociti ed è significativamente sovraregolato durante l'infezione da *C. albicans* e in risposta a trattamenti antifungini quali fluconazolo e anfotericina B (Melo et al., 2013). Analisi trascrittomiche su larve sottoposte a challenge immunitario confermano ulteriormente il suo coinvolgimento in processi legati al citoscheletro, inclusi fagocitosi e segnalazione da stress (Vogel et al., 2011). Questi dati supportano un modello in cui Hem contribuisce alle funzioni immunitarie guidate dall'actina, in particolare all'attivazione degli emociti e alla clearance microbica. Negli esseri umani, Nck-associated protein 1 riveste un ruolo cruciale nella trasduzione del segnale immunitario e nella regolazione del citoscheletro actinico tramite interazione con il complesso WAVE, facilitando la formazione di protrusioni membranose essenziali per l'ingestione fagocitaria (Park et al., 2010; Castro et al., 2020; Christodoulou et al., 2024). Sebbene non siano stati documentati effetti diretti dei probiotici su questa proteina, sia *L. plantarum* sia *L. kefir* hanno dimostrato di potenziare le risposte fagocitarie. *L. plantarum* aumenta l'attività dell'"oxidative burst" e la produzione di citochine nei macrofagi e inibisce l'adesione dei patogeni (Saboktakin-Rizi et al., 2021). Analogamente,

L. kefir migliora la funzione dei macrofagi promuovendone la polarizzazione e la secrezione di peptidi antimicrobici (Hong et al., 2014). Dopo somministrazione dei probiotici, l'espressione di Hem ha raggiunto il picco più precoce nel gruppo LK (3 h), mentre LP ha indotto un picco ritardato ma comparabile a 6 h. Questi differenti schemi cinetici possono riflettere differenze specifiche di ceppo nella mobilitazione o attivazione degli emociti (Figura 1I). La proteina inibitrice delle metalloproteinasi inducibile (IMPI) di *G. mellonella* mostra una limitata somiglianza sequenziale con la mucina-6 umana isoforma X1. La bassa copertura e identità indicano un'omologia ristretta a brevi motivi ricchi di cisteina. Sebbene statisticamente significativa, l'interpretazione biologica richiede cautela, poiché la relazione probabilmente riflette una conservazione convergente dei domini legati ai ponti disolfuro piuttosto che una similitudine funzionale più ampia (Tabella Supplementare 1). L'analisi basata sui domini rivela la presenza di motivi strutturali associati alla protezione della matrice extracellulare (ECM) e all'inibizione delle proteasi. In particolare, IMPI contiene un dominio inibitore della serina-proteasi che blocca efficacemente enzimi proteolitici coinvolti nella degradazione tissutale. Possiede inoltre un dominio TIL (trypsin inhibitor-like) ricco di cisteina, la cui rete estesa di ponti disolfuro garantisce stabilità strutturale e resistenza sia alle proteasi microbiche sia endogene (Yang et al., 2017). Un dominio simile alla fibronectina tipo I media il legame alla ECM, suggerendo un ruolo nella preservazione dell'integrità tissutale durante l'infezione (Smith et al., 1995) (Tabella Supplementare 1). Coerentemente con queste caratteristiche, Vilcinskas & Wedde hanno dimostrato che IMPI è fortemente indotta da sfide microbiche, in particolare in risposta a metalloproteasi batteriche e fungine come la termolisina (Vilcinskas and Wedde, 2002). Neutralizzando questi enzimi associati alla virulenza, IMPI previene la degradazione di componenti epiteliali e ECM, agendo come barriera critica e amplificando l'efficacia del sistema immunitario innato dell'insetto (Vilcinskas and Wedde, 2002). Negli esseri umani, mucine come MUC2 e MUC6 formano una barriera protettiva e modulano le risposte immunitarie locali. Diversi ceppi di *L. plantarum* sono stati segnalati per rafforzare le difese mucosali e ridurre l'infiammazione; ad esempio, il ceppo ZDY2013, in combinazione con isomaltooligosaccaridi, aumenta l'espressione di MUC2, delle proteine delle giunzioni strette (ZO-1, claudina) e di citochine come IL-10 e IL-22 in modelli di colite indotta da DSS (Zhang et al., 2024). Sebbene IMPI non possieda un omologo diretto nei mammiferi, il suo ruolo nella preservazione della ECM e nella modulazione delle risposte dell'ospite richiama le funzioni barriera-protettive e immunomodulatorie delle mucine, suggerendo una convergenza evolutiva nelle strategie impiegate da insetti e mammiferi per contrastare le proteasi microbiche. L'espressione genica di IMPI ha mostrato uno dei profili temporali più divergenti

tra i geni analizzati, con livelli prevalentemente ipoespressi. LP ha indotto un'attivazione precoce ma al di sotto del basale a 3 h, seguita da un modesto aumento a 12 h e una marcata riduzione dopo 18 h, indicando una risposta rapida e transitoria. Al contrario, LK ha mostrato un profilo bifasico con chiara sovraespressione a 6 h, diminuzione a 12 h e un secondo picco a 18 h, suggerendo una modulazione più prolungata e dinamica della protezione tissutale e della stabilizzazione della ECM. La marcata differenza osservata a 18 h sotto trattamento LK sottolinea una regolazione specifica di ceppo di IMPI, con un ruolo distinto nel rimodellamento della ECM e nella modulazione immunitaria. Questo schema di espressione riflette la capacità di LK di indurre sovraespressione transitoria seguita da riattivazione ritardata, mentre LP è caratterizzato da una risposta rapida ma di breve durata (Figura 1J). I profili temporali di espressione dei singoli geni immunitari osservati dopo somministrazione dei due ceppi di *Lactobacillus* sono stati ulteriormente supportati dai risultati delle analisi di correlazione. La correlazione di Spearman tra i due trattamenti (Tabella 3) ha rivelato pattern di espressione sia conservati sia divergenti. Un alto grado di similitudine temporale è stato osservato per diversi geni, tra cui *cad*, *Dorsal*, *spz4*, *Rel*, *gloverin* e *Hem*, confermando che componenti core delle vie Toll e IMD, così come geni effettrici quali AMPs e marker degli emociti, seguono dinamiche di attivazione conservate indipendentemente dal ceppo probiotico. Al contrario, *18w* e *gallerimycin* hanno mostrato correlazioni moderate o deboli, indicando maggiore variabilità inter-ceppo nelle cinetiche di espressione. Geni come NADPH ossidasi 4-like e IMPI non hanno mostrato correlazione significativa tra i trattamenti, con risposte regolatorie distinte a seconda del ceppo somministrato. Inoltre, le matrici di correlazione temporale all'interno dei trattamenti forniscono ulteriori informazioni sulle risposte immunitarie coordinate indotte da ciascun ceppo. Nelle larve trattate con LP, *relish* ha agito come nodo centrale, correlando con *cad*, IMPI, *gallerimycin* e *gloverin*, indicando il suo ruolo nel collegare la segnalazione upstream con le risposte effettrici. NADPH ossidasi 4-like ha mostrato correlazioni inverse con diversi geni immunitari, in particolare *gloverin*, IMPI e *Hem*, evidenziando un percorso redox regolato in maniera indipendente specifico del trattamento LP (Figura 2A). Al contrario, il trattamento LK ha indotto una rete più ampia e sincronizzata, con *cad* significativamente correlato alla maggior parte dei geni. Un modulo strettamente connesso comprendente *spz4*, *gloverin*, *Hem* e IMPI ha indicato risposte coordinate epiteliali e umorali (Figura 2B). Infine, il clustering gerarchico ha confermato moduli trascrizionali specifici del trattamento (Figura 3). Le risposte LP includevano due cluster principali, un modulo antimicrobico (*spz4*, *gloverin*, *Hem*) e un cluster regolatorio (*cad*, *Rel*, IMPI), oltre a un gruppo meno connesso (*Dorsal*, *18w*, *gallerimycin*). NADPH ossidasi 4-like è rimasta isolata (Figura 3A), suggerendo un percorso

regolatorio indipendente. Nelle larve trattate con LK, IMPI si è unita al cluster antimicrobico, suggerendo una maggiore coordinazione tra recettori di riconoscimento, peptidi effettrici e protezione della ECM. NADPH ossidasi 4-like è stata moderatamente integrata, riflettendo un profilo regolatorio più coeso. 18w è rimasta distinta, con minima co-espressione (Figura 3B). Complessivamente, questi risultati dimostrano che *G. mellonella* combina difese umorali (es. AMPs, melanizzazione, oxidative burst) con meccanismi cellulari (attivazione degli emociti e fagocitosi), rispecchiando da vicino le strategie immunitarie innate dei mammiferi nonostante le differenze strutturali (Sheehan et al., 2018). Questa conservazione evolutiva supporta il potenziale traslazionale del modello d'insetto per lo screening degli effetti immunomodulatori dei probiotici. Per quanto a nostra conoscenza, questo è il primo studio a valutare gli effetti immunomodulatori di LP e LK in larve di *G. mellonella* senza challenge patogeno, concentrandosi esclusivamente sulla risposta dell'ospite alla somministrazione probiotica. Studi precedenti hanno principalmente valutato gli effetti protettivi e la potenziale tossicità di probiotici vivi e dei loro derivati (es. supernatanti privi di cellule e BEVs) durante infezioni batteriche o fungine (Rossoni et al., 2017; Guarnieri et al., 2024; Carmo et al., 2025; Lam et al., 2025; Marinacci et al., 2025; Santarelli et al., 2025). Questo studio sposta l'attenzione sull'attivazione diretta dell'immunità innata, analizzando i profili temporali di espressione di dieci geni correlati all'immunità, includendo componenti canonici delle vie Toll e IMD, peptidi antimicrobici, mediatori dello stress ossidativo e marker dell'integrità epiteliale. I risultati evidenziano profili genici specifici per ceppo e temporalmente distinti, supportando l'uso di questo modello come strumento preclinico per lo screening di proprietà immunomodulatorie dei probiotici. Inoltre, l'allineamento in silico e l'analisi funzionale hanno rivelato un pattern stratificato di omologia tra proteine di *G. mellonella* e i loro omologhi umani. La maggiore conservazione è stata osservata per Hem-NCKAP1 e NOX4-like-NOX4, con estesa copertura e alta identità sequenziale, a supporto del loro ruolo nella regolazione del citoscheletro e nell'immunità mediata da redox. Livelli intermedi di conservazione sono stati riscontrati per ortologi NF- κ B (Dorsal-p65, Rel-p100) e CDX2, evidenziando la preservazione di domini trascrizionali chiave. Al contrario, proteine come 18-wheeler (TLR7-like) e IMPI hanno mostrato somiglianza limitata o circoscritta a domini specifici. Nel complesso, i risultati evidenziano un grado eterogeneo di conservazione, sottolineando la necessità di ulteriori studi funzionali e strutturali per validare questi candidati e identificare target aggiuntivi rilevanti per l'immunologia traslazionale. Alcuni geni, come *spz4*, *gloverin* e *gallerimycin*, mancano ancora di validazione biochimica o funzionale dettagliata sia nei sistemi insetto sia mammifero, e la loro interpretazione richiede cautela. Infine, il modello *G. mellonella* non sostituisce i test *in*

vivo su mammiferi; piuttosto, rappresenta un sistema preclinico economico ed eticamente vantaggiosa per identificare ceppi probiotici candidati e chiarire i meccanismi d'azione prima della sperimentazione su vertebrati. In conclusione, questo studio introduce un uso innovativo di *G. mellonella* per indagare le interazioni immunitarie ospite-microbo, rivelando modulazione immunitaria dipendente dal ceppo e rafforzando l'utilità del modello come modello per screening funzionale con potenziale applicabilità umana.

Attività 2: Studio dei batteri lattici isolati dal latte materno umano: valutazione dell'attività antimicrobica e della modulazione immunitaria nel modello di ferita da ustione in *Galleria mellonella*.

Razionale dello studio

Le ferite da ustione rappresentano una minaccia rilevante nell'ambito sanitario a causa della loro potenziale compromissione della pelle, la prima linea di difesa dell'organismo, esponendo così gli individui al rischio di infezione e squilibrio dei fluidi. Il carico globale delle lesioni termiche, con oltre 250.000 decessi riportati ogni anno, colpisce principalmente le popolazioni dei paesi in via di sviluppo, con accesso limitato a cure mediche adeguate (Rybarczyk et al., 2016). Spesso, le lesioni interne associate a ustioni estese del corpo comportano rigidità e la mortalità raggiunge livelli critici nei pazienti gravemente ustionati (Forbinake et al., 2020). Nonostante gli sforzi volti a mantenere la sterilità, le ferite da ustione risultano altamente suscettibili alla colonizzazione microbica e alla successiva infezione, in particolare durante la prima settimana post-lesione (Ladhani et al., 2021). La ferita fornisce un ambiente ideale per la proliferazione di microrganismi come i batteri Gram-negativi. Il trattamento standard delle ferite da ustione include la gestione della ferita, il controllo del dolore e l'uso di antibiotici per prevenire o trattare le infezioni. Il debridement, che comporta la rimozione del tessuto necrotico, costituisce un passaggio critico per prevenire l'infezione e favorire la guarigione (Jeschke et al., 2020). Le ferite da ustione richiedono spesso terapie antibiotiche aggressive per ridurre il rischio di infezione sistemica e sepsi. Tradizionalmente, gli aminoglicosidi, come la gentamicina, rappresentano un pilastro della terapia antibiotica nei pazienti ustionati, mostrando efficacia contro un ampio spettro di batteri, inclusi patogeni opportunisti come *Pseudomonas aeruginosa* (Corcione et al., 2021). Tuttavia, l'emergere della resistenza agli antibiotici rappresenta un ostacolo significativo al trattamento efficace delle infezioni da ferite da ustione, rendendo necessarie strategie terapeutiche alternative. Tra queste vi sono l'uso di medicazioni antimicrobiche impregnate di argento o miele, che hanno dimostrato efficacia nella riduzione del carico batterico e nel promuovere la guarigione della ferita (Leaper et al., 2011). Altri approcci innovativi includono la terapia a pressione negativa, che applica una suzione controllata all'area della ferita, migliorando la perfusione tissutale e riducendo l'edema (Huang

et al., 2014; Agarwal et al., 2019; Norman et al., 2022). Inoltre, i Lattobacilli (LAB), in particolare le specie del genere *Lactobacillus*, hanno suscitato interesse per le loro potenziali proprietà antimicrobiche e immunomodulatorie (Argenta et al., 2016). I LAB hanno dimostrato la capacità di inibire la crescita di batteri patogeni, inclusi *P. aeruginosa*, promuovendo contemporaneamente i processi di guarigione della ferita (Andrejko et al., 2021). I LAB rappresentano quindi una promettente opzione per terapie complementari future nella prevenzione e gestione delle ferite da ustione, grazie ai loro meccanismi diversificati, tra cui l'esclusione competitiva, la produzione di sostanze antimicrobiche e la modulazione delle risposte immunitarie dell'ospite. Tuttavia, la valutazione di agenti antimicrobici e immunomodulatori nella ricerca sulle ferite da ustione risulta intrinsecamente complessa a causa della natura complessa di queste lesioni. I modelli *in vitro* non riproducono la complessità delle ferite da ustione, mentre i modelli mammiferi di grandi dimensioni presentano limitazioni pratiche come costi elevati, problemi etici e vincoli logistici (Hao and Nourbakhsh, 2021). L'uso dei batteri nelle lesioni da ustione e nella guarigione delle ferite da ustione è stato studiato da vari gruppi in numerosi studi animali *in vivo*, con risultati promettenti (Maitz et al., 2023). In questo contesto, *G. mellonella* rappresenta uno strumento prezioso per lo studio delle infezioni delle ferite da ustione. Innanzitutto, evita le problematiche etiche associate ai modelli animali vertebrati. Inoltre, si tratta di un modello economico che consente sperimentazioni ad alto numero di campioni, facilitando lo studio di vari trattamenti e la rapida ed efficiente selezione di composti antimicrobici. Il modello di *G. mellonella* permette inoltre di differenziare ceppi batterici ad alta e bassa patogenicità, risultando utile per studi sulla virulenza, per testare l'efficacia dei trattamenti contro specifici patogeni e per valutare l'attività antagonista batterica *in vivo*. Negli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato che *G. mellonella* possiede un sistema immunitario innato costituito da emociti, in grado di produrre peptidi antimicrobici (AMP) e di svolgere fagocitosi. Esso agisce in modo analogo all'immunità innata umana e condivide molte caratteristiche con i mammiferi, inclusi i meccanismi di difesa cellulare e umorale. L'emolinfa delle larve di *G. mellonella* è quasi priva di germi, riducendo significativamente il rischio di contaminazioni interne che potrebbero interferire con gli studi di infezione *in vivo* e con l'analisi dell'espressione genica (Kavanagh and Reeves, 2004; Venditti et al., 2021). Infine, le ustioni indotte sulla superficie delle larve di *G. mellonella* possono replicare molti aspetti delle ustioni umane, inclusa la progressione dell'infezione (Tsai et al., 2016; Lange et al., 2018; Maslova et al., 2020, 2021, 2023). Grazie a queste caratteristiche, *G. mellonella* rappresenta un modello alternativo adatto per studiare l'efficacia dei LAB vivi nella prevenzione e nel controllo delle infezioni delle ferite da ustione. Infatti,

utilizzando questo innovativo modello di ferita, lo scopo del presente studio è valutare le attività antibatteriche e immunomodulatorie dei LAB isolati dal latte materno umano nel contesto della prevenzione delle infezioni da ferite da ustione e indagare i processi di regolazione e modulazione del sistema immunitario di *G. mellonella*. Queste conoscenze potrebbero contribuire a progettare approcci clinici più efficaci per il trattamento profilattico delle ustioni nell'uomo in futuro (Maslova et al., 2020, 2021, 2023).

Test di suscettibilità antimicrobica

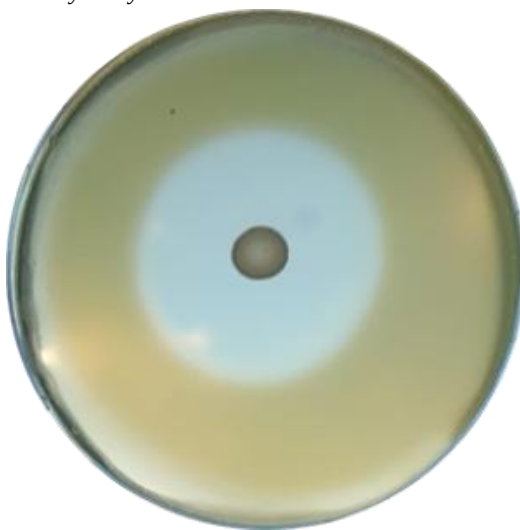
La suscettibilità antibiotica di *P. aeruginosa* ATCC 27583 è stata valutata mediante metodo della Concentrazione Minima Inibente (MIC) come descritto in precedenza da Blandino et al. e Petronio et al., con alcune modifiche (Blandino et al., 2016; Petronio Petronio et al., 2020). Terreni, preparazione dell'inoculo, diluizioni antibiotiche e condizioni di incubazione sono stati scelti secondo le linee guida CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Wayne, PA, USA, 2020). La gentamicina è stata utilizzata come antibiotico test con un intervallo di diluizione di 64-0,125 µg/ml. La suscettibilità antibiotica di *P. aeruginosa* ATCC 27583 è stata valutata anche tramite il metodo della diffusione su disco (Disk Diffusion, DD), secondo le linee guida CLSI M100 (32^a edizione), utilizzando dischi da 10 µg di gentamicina (Sami Awayid and Qassim Mohammad, 2022; Aggarwal et al., 2024).

Test di sovrapposizione antimicrobica (Antimicrobial overlay assay)

Il test di sovrapposizione antimicrobica è stato eseguito secondo il metodo di Hossain et al. (Hossain et al., 2022) con alcune modifiche. Brevemente, un volume predefinito di terreno MRS è stato versato in piastre Petri da 90 mm per preparare lo strato basale di agar. Dopo la solidificazione, 10 µl di sospensione 0,5 McFarland con una concentrazione finale di 1×10^6 UFC di ciascun ceppo di LAB sono stati posizionati al centro della piastra e incubati in condizioni anaerobiche per tutta la notte a 37 °C. Il giorno successivo, una sospensione 0,5 McFarland di *P. aeruginosa* ATCC 27583 è stata aggiunta a soft agar MH fino a ottenere una concentrazione finale di 1×10^6 UFC/ml. Lo strato di soft agar è stato quindi versato sopra lo strato basale preparato in precedenza e, dopo la solidificazione, le piastre sono state re-incubate overnight a 37 °C (Maricic and Dawid, 2014; Hockett and Baltrus, 2017; Riera et al., 2017). Dopo incubazione, tutte le zone di inibizione sono state misurate a occhio nudo con un righello

al millimetro più vicino (Figura 1). Il diametro medio degli aloni di inibizione è stato calcolato da 3 repliche di 3 esperimenti indipendenti.

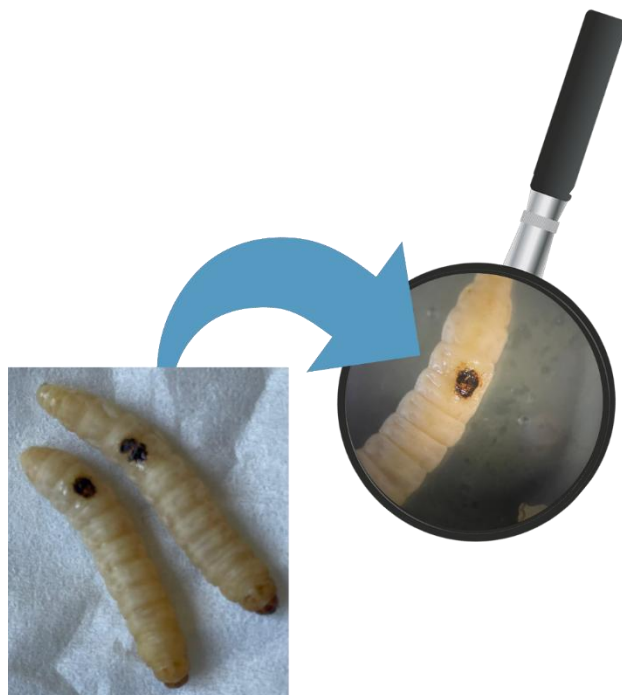
Figura 1. Esempio di antimicrobial overlay assay.



Induzione in vivo di ustioni nelle larve di *G. mellonella*

L'induzione delle ustioni è stata effettuata secondo Maslova et al. (Maslova et al., 2020, 2023). Brevemente, il 70% di etanolo è stato utilizzato per disinfettare la superficie delle larve, assicurando la copertura completa del corpo. Le piastre Petri sono state lasciate scoperte in ambiente sterile per permettere l'evaporazione dell'etanolo. Tamponi delle larve disinfettate sono stati seminati su terreno CLED per verificare la procedura. Le larve sono state posizionate sul lato ventrale e immobilizzate fissando testa e torace. Uno strumento di ustione, un chiodo in acciaio incassato in sughero con testa di 2 mm², è stato riscaldato alla fiamma di un becco Bunsen fino a diventare rosso/bianco e applicato per 4 secondi sul segmento centrale del dorso fino a osservare variazione di colore (bruno scuro-nero) nel tegumento (Figura 2). Larve con significativa perdita di emolinfa o protrusione del corpo adiposo post-procedura sono state scartate e eutanassizzate immediatamente a -20 °C per almeno 20 minuti. Tutte le larve sono state incubate a 35 °C per 48 h. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplice copia, includendo un gruppo di larve naive ("controllo ambientale", EC) per verificare l'assenza di interferenze.

Figura 2. Burn wound sulle larve di *G. mellonella*.



Trattamento profilattico della ferita da ustione con LAB vivi

Dopo l'induzione delle ustioni, una colonia di LAB è stata trasferita sulla ferita mediante anello sterile da 10 µl. Dopo 10 minuti, 10 µl di inoculo di *P. aeruginosa* sono stati applicati sulla ferita trattata. I gruppi controllo non hanno ricevuto trattamento post-ustione, se non 10 µl di soluzione salina (PW). Le larve sono state incubate a 35 °C per 48 h e la mortalità è stata registrata a 0, 6, 12, 18, 24, 36, 42 e 48 h, identificando come morte l'immobilità completa anche a stimolazione esterna. Ogni esperimento è stato eseguito in triplice copia, con un gruppo aggiuntivo di larve naive (EC).

Trattamento profilattico della ferita da ustione con gentamicina topica allo 0,1%

Dopo l'induzione delle ustioni, la gentamicina 0,1% è stata applicata sulla ferita centrale mediante anello sterile da 10 µl. Successivamente, 10 µl di inoculo di *P. aeruginosa* sono stati aggiunti. Il gruppo di controllo GENTA ha ricevuto solo gentamicina 0,1% post-ustione; il gruppo PW ha ricevuto solo soluzione salina. Le larve sono state incubate a 35 °C per 48 h, e la mortalità è stata registrata come descritto sopra. Ogni esperimento è stato eseguito in triplice copia.

Infezione della ferita da ustione

10 µl di inoculo di *P. aeruginosa* ($1,3 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC) sono stati applicati sulla ferita della larva come descritto da Maslova et al. (Maslova et al., 2023). Le larve sono state incubate in piastre da 10 cm a 35 °C, e il numero di larve morte è stato valutato da 1 a 4 giorni post-infezione. La larva è stata considerata morta se non rispondeva al tatto (Figura 3). Ventiquattro larve sono state infettate con *P. aeruginosa* come gruppo controllo infezione (PA). L'esperimento è stato eseguito in triplice copia, con 8 larve per replica.

Figura 3. *G. mellonella* larvae trattate con *P. aeruginosa* ATCC 2758.



Sopravvivenza di *G. mellonella*

24 larve sono state suddivise in 12 gruppi, come mostrato nella Tabella 1.

Tabella 1. Nomi e numero delle larve per ciascun gruppo. EC = larve di controllo naïve; PW = larve con ferita da ustione trattate con soluzione fisiologica; PA = larve con ferita da ustione infettate con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; L1 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L1 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L2 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L2 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L3 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L3 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L4 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L4 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; LR + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con LR e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; LP + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con *Lactobacillus plantarum* (LP) e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; LK + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con *Lactobacillus kefir* (LK) e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; GENTA = larve con ferita da ustione trattate con formulazione topica di gentamicina allo 0,1%; GENTA + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con formulazione topica di gentamicina allo 0,1% e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853.

[illegible]

Estrazione di RNA, amplificazione cDNA e qRT-PCR

12 ore dopo il trattamento, le larve sono state anestetizzate a 4 °C per 10 minuti. La parte terminale dell'addome è stata rimossa con lama chirurgica sterile, e l'emolinfa è stata raccolta in tubi Eppendorf da 1,5 ml mantenuti su ghiaccio per evitare la melanizzazione (Moya-Andérico et al., 2020). L'RNA è stato estratto secondo il protocollo TRIzol (Invitrogen). Il cDNA è stato sintetizzato utilizzando kit ad alta capacità con inibitore di RNase (Applied Biosystems™). La qRT-PCR è stata eseguita con PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) su Rotor-Gene Q (Qiagen). Sono stati utilizzati primer specifici per il peptide antimicrobico *gallerimycin* (GAL) e il fattore di trascrizione *relish/NF-κB* (REL) (Tabella 2). I risultati sono stati normalizzati sul gene housekeeping Elongation factor 1-Alpha (EF1) e presentati come valori relativi rispetto alle larve naive (EC). Le variazioni di espressione genica sono state calcolate mediante metodo DeltaDeltaCT (Melo et al., 2013; Sarvari et al., 2020). Gli esperimenti sono stati eseguiti con tre repliche biologiche e tre repliche tecniche.

Tabella 2. Lista dei primers usati (qRT-PCR).

NOME PRIMER	FORWARD	REVERSE	REFERENZA
<i>relish/NF-κB</i>	TCCAAAAAGCACCTACAATCG	GCACTTCGTAGCTCACATCTC	Sarvari et al. 2020 ²⁰
Fattore di elongazione 1-Alpha	AACCTCCTTACAGTGAATCC	ATGTTATCTCCGTGCCAG	Rodrigues et al. 2013 ²¹
<i>gallerimycin</i>	AACCATCACCGTCAAGCCA	TCGAAGACATTGACATCCATTGA	Sarvari et al. 2020 ²⁰

Risultati

Test di suscettibilità antimicrobica

Per *P. aeruginosa* ATCC 27853, la MIC del gentamicina è risultata pari a 2 µg/ml, mentre il diametro dell'alone di inibizione con 10 µg di gentamicina è di 17 mm. I risultati sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3. MIC e DD di *P. aeruginosa* ATCC 27853 versus gentamicina.

CEPPO	MIC GENTAMICIN	ALONE DI INIBIZIONE (10µg gentamicin)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2 µg/ml	17mm

Saggio di sovrapposizione antimicrobica

Tutti i ceppi di LAB hanno mostrato un'eccellente attività antibatterica contro *P. aeruginosa*, ad eccezione del ceppo L2 (Tabella 4). I LAB isolati dal latte materno umano (LAB non commerciali) hanno inibito la crescita di *P. aeruginosa* in misura uguale o superiore rispetto ai ceppi commerciali; in particolare, L3 ha mostrato la più alta attività antimicrobica *in vitro* (45 mm), seguita da LK (43 mm) e da LP e L4 ex aequo (40 mm).

Tabella 4. Risultati dell'agar overlay assay contro *P. aeruginosa* ATCC 27853. Le dimensioni degli aloni di inibizione osservati rappresentano la media di tre replicati provenienti da tre esperimenti indipendenti.

CAMPIONE	ALONE DI INIBIZIONE (mm)
<i>Leuconostoc citreum</i> DSM 34870 (L1)	36±2
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> DSM 34871 (L2)	28±2
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> DSM 34872 (L3)	45±1
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> DSM 34873 (L4)	40±2
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 53103 (LR)	33±1
<i>Lentilactobacillus kefir</i> DSM 32079 (LK)	43±1
<i>Lactoplantibacillus plantarum</i> ATCC 14917 (LP)	40±1

Infezione da ferita da ustione in *G. mellonella*

Come descritto precedentemente, 10 µl di inoculo di *P. aeruginosa* sono stati somministrati ai larvi di *G. mellonella*, e il tasso di mortalità dopo 24 ore è risultato pari all'87,5% (Tabella 5).

Tabella 5. La percentuale di mortalità è stata calcolata sommando il numero di larve morte nei tre replicati e dividendo tale valore per il numero totale di larve (24). PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ceppo	OD600	CFU/ml	Tasso di mortalità (24h)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.1	$1.3 \pm 0.2 \times 10^8$	87.50%

La colonizzazione da LAB migliora la sopravvivenza di *G. mellonella*

In precedenza è stato valutato il tasso di sopravvivenza dei larvi ustionati trattati esclusivamente con LAB, non riscontrando mortalità (dati non mostrati). Successivamente, l'attività protettiva dei LAB contro *P. aeruginosa* è riportata nelle Figure 4A, 4B e 4C. Tutti i larvi del gruppo PA sono deceduti a 36 h dall'infezione, mentre quelli pre-trattati con LAB sono sopravvissuti fino a 48 h. A 20 h, LR si è rivelato il ceppo con la migliore attività protettiva. A 48 h dall'infezione, L1 ha mostrato un'attività protettiva minore, riducendo la mortalità del 41,7%, seguito da LK e LP, con riduzioni pari al 66,7%, mentre L2, L3, L4 e LR hanno ridotto la mortalità del 75%. L'analisi statistica dei gruppi di trattamento profilattico L1, L2, L3, L4, LR, LP e LK ha evidenziato una riduzione significativa della mortalità rispetto al gruppo PA (Tabella 6). Questi risultati suggeriscono che tutti i LAB testati hanno mostrato efficacia nell'attività antimicrobica *in vivo*. Non sono state invece osservate differenze significative tra i ceppi L1, L2, L3 e L4 rispetto ai ceppi LR, LP e LK.

Tabella 6. Le stime di sopravvivenza sono state calcolate utilizzando il metodo di Kaplan-Meier, con significatività determinata tramite il test del chi-quadro basato sull'approssimazione log-rank. Sono riportati i confronti a coppie (pairwise comparisons). $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,0001 = ****$.

	EC	PW	PA	L1+PA	L2+PA	L3+PA	L4+PA	LR+PA	LP+PA	LK+PA	GENTA	GENTA+P A
EC		0.1529	≤ 0.0001	≤ 0.001	0.1135	0.1281	0.1135	0.1262	≤ 0.05	≤ 0.05	0.5386	0.1252
PW	0.1529		≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.01	≤ 0.01	≤ 0.01	≤ 0.01	≤ 0.01	≤ 0.01	0.3173	≤ 0.01
PA	≤ 0.0001	≤ 0.0001		≤ 0.01	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001
L1+PA	≤ 0.001	≤ 0.0001	≤ 0.01		≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	0.0675	0.1556	≤ 0.0001	≤ 0.05
L2+PA	0.1135	≤ 0.01	≤ 0.0001	≤ 0.05		0.9140	1.0000	0.8604	0.6763	0.5280	≤ 0.05	0.8789
L3+PA	0.1281	≤ 0.01	≤ 0.0001	≤ 0.05	0.9140		0.9140	0.9823	0.5430	0.4441	≤ 0.05	0.9949
L4+PA	0.1135	≤ 0.01	≤ 0.0001	≤ 0.05	1.0000	0.9140		0.8604	0.6763	0.5280	≤ 0.05	0.8789
LR+PA	0.1262	≤ 0.01	≤ 0.0001	≤ 0.05	0.8604	0.9823	0.8604		0.5195	0.3956	≤ 0.05	0.9837
LP+PA	≤ 0.05	≤ 0.01	≤ 0.0001	0.0675	0.6763	0.5430	0.6763	0.5195		0.7890	≤ 0.01	0.5407
LK+PA	≤ 0.05	≤ 0.01	≤ 0.0001	0.1556	0.5280	0.4441	0.5280	0.3956	0.7890		≤ 0.01	0.4116
GENTA	0.5386	0.3173	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.01	≤ 0.01		≤ 0.05
GENTA+P A	0.1252	≤ 0.01	≤ 0.0001	≤ 0.05	0.8789	0.9949	0.8789	0.9837	0.5407	0.4116	≤ 0.05	

La colonizzazione da LAB equivale all'attività antibiotica della formulazione topica di gentamicina

Come già descritto, tutti i larvi del gruppo PA sono deceduti a 36 h dall'infezione. A 48 h, i larvi pre-trattati con la formulazione topica di gentamicina hanno mostrato una riduzione della mortalità del 75% rispetto al gruppo infettato con PA. Come illustrato in Figura 4 e 5, sia il trattamento profilattico con LAB sia quello con gentamicina hanno indotto una riduzione significativa e simile delle infezioni rispetto ai controlli ($p \leq 0,001$).

Figura 4. Curve di sopravvivenza di larve con ferite da ustione in vivo pre-trattate con tutti i ceppi di LAB (A), con ceppi commerciali (B) e con ceppi non commerciali (C) rispetto al gruppo PA. EC = larve di controllo naïve; PW = larve con ferita da ustione trattate con soluzione fisiologica; PA = larve con ferita da ustione infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L1 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L1 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L2 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L2 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L3 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L3 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L4 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L4 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; LR + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con LR e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; LP + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con *Lactobacillus plantarum* (LP) e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; LK + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con *Lactobacillus kefir* (LK) e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853.

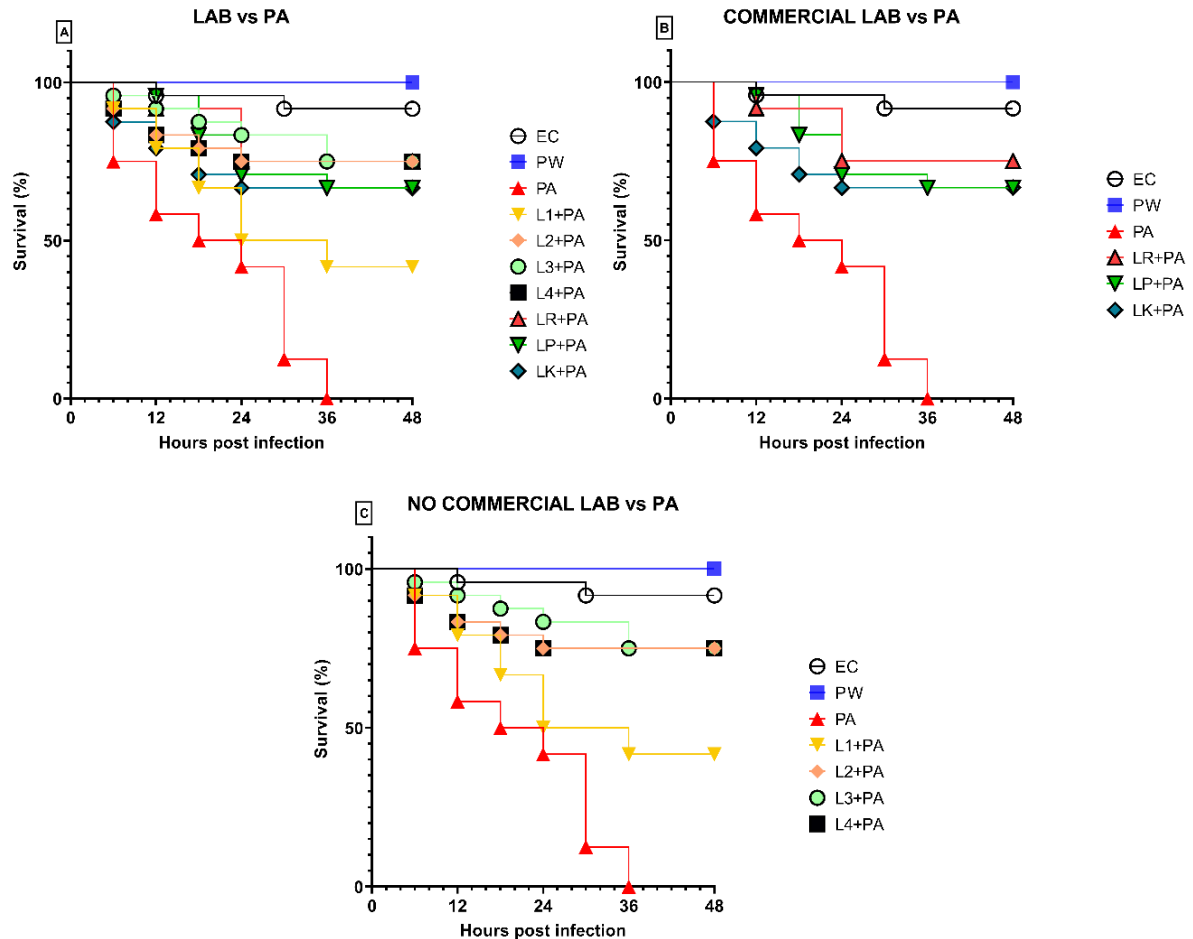
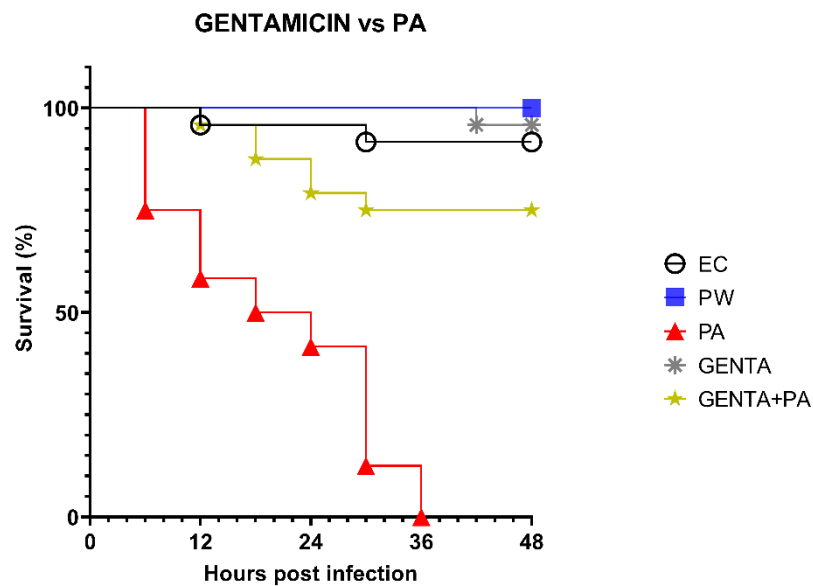


Figura 5. Curve di sopravvivenza delle larve con ferita da ustione in vivo trattate con formulazione topica di gentamicina rispetto al gruppo PA. EC = larve di controllo naïve; PW = larve con ferita da ustione trattate con soluzione fisiologica; PA = larve con ferita da ustione infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; GENTA = larve con ferita da ustione trattate con formulazione topica di gentamicina allo 0,1%; GENTA + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con formulazione topica di gentamicina allo 0,1% e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853.



Livelli di espressione di mRNA di *gallerimycin* e *relish*/NF- κ B

I livelli di mRNA di *gallerimycin* e *relish*/NF- κ B nei larvi con ferita da ustione sono sintetizzati rispettivamente nelle Figure 6A e 6B. È stata osservata una differenza altamente significativa nei livelli di mRNA di *gallerimycin* tra i gruppi PA e PW di controllo ($p \leq 0,0001$), indicando un notevole impatto dell'infezione da *P. aeruginosa* sull'espressione genica rispetto al gruppo di controllo (Figura 6A). Analogamente, tra il gruppo PA di controllo e il gruppo L1+PA è stata registrata una differenza significativa ($p \leq 0,001$), così come per tutti gli altri trattamenti (L2+PA, L3+PA, L4+PA, LR+PA, LP+PA, LK+PA, GENTA, GENTA+PA) $p \leq 0,0001$ (Figura 6A). I livelli di mRNA di *relish*/NF- κ B non hanno mostrato differenze significative rispetto al controllo (Figura 6B). Inoltre, è stata osservata una correlazione negativa statisticamente significativa tra i larvi infettati da PA e trattati con L1 e L3; al contrario, per L2 e L4 è stata riscontrata una correlazione positiva significativa. Per gli altri gruppi di trattamento non sono state rilevate correlazioni statisticamente significative (Tabella 7).

Figura 6. Livelli di mRNA di gallerimycin (A) e relish/NF- κ B (B). PW = larve con ferita da ustione trattate con soluzione fisiologica; PA = larve con ferita da ustione infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L1 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L1 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L2 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L2 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L3 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L3 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; L4 + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con L4 e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; LR + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con LR e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; LP + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con *Lactobacillus plantarum* (LP) e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; LK + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con *Lactobacillus kefir* (LK) e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853; GENTA = larve con ferita da ustione trattate con formulazione topica di gentamicina allo 0,1%; GENTA + PA = larve con ferita da ustione pre-trattate con formulazione topica di gentamicina allo 0,1% e infettate con *P. aeruginosa* ATCC 27853. *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$; la lettera "a" indica la significatività statistica rispetto al gruppo PA.

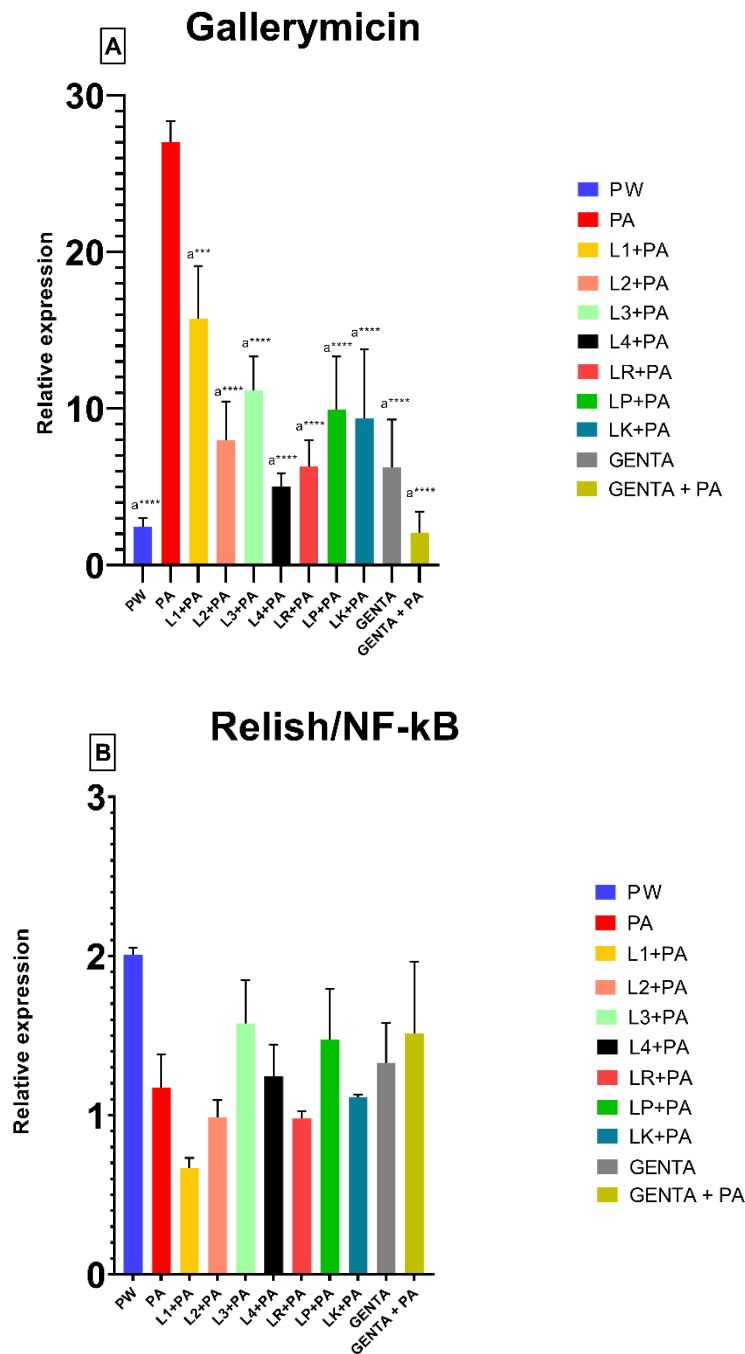


Tabella 7. I coefficienti di correlazione sono stati calcolati utilizzando il metodo non parametrico della correlazione per ranghi di Spearman. $p \leq 0,01 = **$.

	PA REL	L1+PA REL	L2+PA REL	L3+PA REL	L4+PA REL
PA GAL	-1.000**				
L1+PA GAL		-1.000**			
L2+PA GAL			+1.000**		
L3+PA GAL				-1.000**	
L4+ PA GAL					+1.000**

Discussione

Le ustioni gravi rappresentano una delle forme più devastanti di trauma, richiedendo cure mediche immediate e altamente specializzate. Lo stato di immunosoppressione indotto dal trauma da ustione, insieme al microambiente locale della ferita, favorisce la colonizzazione e la proliferazione microbica. Tra gli agenti eziopatologici batterici più rilevanti nelle infezioni da ustione, desta particolare preoccupazione il patogeno opportunisto *Pseudomonas aeruginosa*, un batterio Gram-negativo, bastoncello anaerobio facoltativo, non fermentante, asporigeno e dotato di motilità tramite flagello polare (Fakhry and Aljanabi, 2024). Questo microrganismo è responsabile di gravi ritardi nei processi di guarigione dei pazienti ustionati e, in alcuni casi, di exitus, principalmente a causa della diffusione di ceppi multi-resistenti (Azzopardi et al., 2014; Fournier et al., 2016; Gonzalez et al., 2016). Il lavoro di Cutuli et al. (Cutuli et al., 2019) descrive in modo approfondito le principali caratteristiche di *G. mellonella* in microbiologia, evidenziandone l'utilizzo come modello *in vivo* per lo sviluppo di nuove strategie antibatteriche. Successivamente, Maslova et al. (Maslova et al., 2020, 2023), utilizzando le larve di *G. mellonella* come modello di ustione, hanno dimostrato come esse riproducano fedelmente le caratteristiche fondamentali del trauma e dell'infezione da ustione osservate nei modelli mammiferi. Sulla base di ciò, nel presente studio è stato impiegato questo modello per indagare le proprietà antimicrobiche e immunomodulatrici di ceppi vivi di lattobacilli (LAB) derivati da latte materno umano, confrontandoli con tre ceppi commerciali (*Lactobacillus plantarum*, *L. kefir* e *L. rhamnosus*) nella gestione delle infezioni da ferite da ustione (Köhler, 2015; Champion et al., 2016). L'attività antimicrobica *in vitro*, valutata mediante *overlay assay*, ha rivelato una marcata azione inibitoria dei LAB testati nei confronti di *P. aeruginosa* ATCC 27853. Tale metodica rappresenta uno strumento di screening preliminare rapido, economico, affidabile e di semplice interpretazione, ampiamente impiegato nella ricerca antimicrobica. Essa consente di osservare e confrontare specifiche zone di inibizione, utili nell'identificazione di composti attivi o di interazioni tra diversi microrganismi (Maricic and Dawid, 2014; Hockett and Baltrus, 2017; Riera et al., 2017; Hossain et al., 2022). Nel presente studio sono state utilizzate cellule intere di LAB derivati da latte umano per riprodurre il più fedelmente possibile le condizioni naturali di interazione tra *Lactobacillus* vivi e patogeni. L'impiego di cellule vitali è cruciale non solo per valutare i composti antimicrobici prodotti, ma anche per indagare gli eventuali effetti sinergici delle cellule probiotiche nel contrastare le infezioni (Hernández et al., 2005; Salas-Jara et al., 2016). Sebbene l'uso di surnatanti privi di cellule (CFS) consenta di analizzare i composti secreti dai batteri, il nostro

obiettivo è stato quello di valutare l'attività antimicrobica complessiva, includendo le interazioni dirette tra cellule vive e patogeni. Tra i ceppi analizzati, *L. fermentum* DSM 34872 (L3) ha mostrato il maggiore effetto inibitorio sulla crescita di *P. aeruginosa*, superando sia i ceppi commerciali sia il test di diffusione su disco (DD) con gentamicina (10 µg), seguito da *L. kefir* DSM 32079 (LK), *L. fermentum* DSM 34873 (L4) e *L. plantarum* ATCC 14917 (LP) (Tabella 4). Questi risultati sono coerenti con quanto riportato in letteratura sull'attività antimicrobica dei LAB contro diversi patogeni batterici, inclusa *P. aeruginosa* (Azzopardi et al., 2014). Tuttavia, un confronto diretto tra overlay assay e metodo DD non è possibile, in quanto basati su principi metodologici differenti. Il primo prevede l'inoculazione del batterio in un agar morbido sovrapposto a un agar di base pre-inoculato, mentre il secondo impiega dischetti impregnati di antibiotico posti sulla superficie dell'agar. Nonostante tali differenze, il metodo DD rimane utile per interpretare i risultati ottenuti con la gentamicina (Gaudreau et al., 2008; Hossain et al., 2022). L'attività antimicrobica *in vitro* dei LAB è stata quindi confrontata con il tasso di sopravvivenza delle larve trattate *in vivo*. I risultati si sono dimostrati coerenti per tutti i LAB testati, ad eccezione del ceppo L2 (Figure 4A-C). Nessuna mortalità è stata osservata nel gruppo di controllo trattato termicamente (PW), confermando che i decessi osservati erano imputabili all'infezione da *P. aeruginosa* e non al trauma da ustione. Sebbene il ceppo L2 avesse mostrato *in vitro* un alone di inibizione ridotto, *in vivo* ha evidenziato, insieme a L3 e L4, la più elevata attività protettiva, riducendo la mortalità larvale del 75%. Tale discrepanza conferma come gli esperimenti *in vitro* non possano sostituire completamente quelli *in vivo* (Lorian, 1988). Lo studio ha inoltre confrontato l'efficacia del trattamento profilattico con LAB vivi con quella di una formulazione topica di gentamicina, un aminoglicoside comunemente utilizzato nella gestione delle ustioni infette (Corcione et al., 2021). In linea con la letteratura, la gentamicina ha mostrato un'elevata efficacia contro *P. aeruginosa* (Nuutila et al., 2020). Tuttavia, sorprendentemente, sia i LAB (in particolare L2, L3, L4 e *L. rhamnosus* ATCC 53103, LR) sia la gentamicina hanno evidenziato effetti protettivi comparabili nel modello di *G. mellonella* (Figure 4A-C). L'analisi dell'espressione genica sull'emolinfa ha rivelato significative alterazioni nei livelli di geni correlati alla risposta immunitaria, in particolare *gallerimycin*, in seguito all'infezione da *P. aeruginosa* e ai trattamenti profilattici con LAB (Figura 6A). Studi precedenti hanno evidenziato che la risposta immunitaria di *G. mellonella* varia in funzione del tipo di microrganismo: mentre i batteri patogeni, come *P. aeruginosa*, inducono una forte attivazione degli AMP e un aumento dell'attività emocitaria (Tsai et al., 2016), i batteri non patogeni, come i LAB, evocano risposte più moderate (Mastromarino et al., 2014). La *gallerimycin* è un AMP cruciale nella risposta

immunitaria innata di *G. mellonella* e presenta analogie strutturali con le defensine di altri insetti e vertebrati, suggerendo un meccanismo d'azione conservato attraverso le specie (Tsai et al., 2016; Ménard et al., 2021). I risultati di questo studio confermano una significativa sovraespressione di *gallerimycin* nelle larve infettate da *P. aeruginosa*, indicativa dell'attivazione del sistema immunitario larvale. Il trattamento profilattico con LAB ha attenuato tale sovraespressione, suggerendo una modulazione della risposta immunitaria verso un fenotipo meno infiammatorio, come descritto in letteratura (Andrejko et al., 2021). Il secondo gene analizzato, *relish/NF-κB*, rappresenta un fattore di trascrizione chiave della via IMD negli insetti, analoga alla via NF-κB dei vertebrati. Tale via svolge un ruolo essenziale nella risposta immunitaria precoce contro infezioni microbiche, in particolare quelle da batteri Gram-negativi (Sarvari et al., 2020; Cammarata-Mouchtouris et al., 2022; Petronio Petronio et al., 2022; Mahanta et al., 2023). L'analisi qRT-PCR ha evidenziato variazioni moderate dell'espressione di *relish/NF-κB* dopo 12 ore di trattamento. In particolare, è stata osservata ipo-espressione in tutte le condizioni, eccetto nei gruppi PW, L3 e LP, che mostravano una lieve sovraespressione (Figura 6B). L'analisi di correlazione di Spearman ha rivelato una correlazione statisticamente significativa, dipendente dal ceppo, tra l'espressione di *relish/NF-κB* e *gallerimycin* nei LAB non commerciali (Tabella 7). Tale correlazione suggerisce un possibile meccanismo di retroazione negativo, già descritto in *Drosophila*, in cui *relish/NF-κB* regola l'eccessiva espressione degli AMP durante la fase acuta dell'infezione (Pan et al., 2023). Nel complesso, questi risultati supportano la capacità immunomodulatrice dei LAB vivi. In conclusione, il presente studio ha dimostrato che il trattamento profilattico con LAB vivi è efficace contro *P. aeruginosa* sia *in vitro* che *in vivo*, con un'efficacia paragonabile, in alcuni casi, a quella della gentamicina. Inoltre, i LAB risultano in grado di modulare il sistema immunitario dell'ospite, potenziando le difese antipatogene e riducendo le risposte infiammatorie dannose. Questo lavoro possiede un notevole potenziale innovativo poiché esplora una nuova strategia terapeutica per il trattamento delle ferite da ustione, che, oltre a prevenire le infezioni opportunistiche, potrebbe ridurre la dipendenza dagli antibiotici tradizionali e contribuire così a contrastare il problema globale dell'antibiotico-resistenza. Tuttavia, vanno riconosciute alcune limitazioni: il modello larvale di *G. mellonella*, come altri modelli alternativi, non riproduce completamente la complessità delle ferite da ustione umane (Cutuli et al., 2021). Le larve, infatti, non sono in grado di rigenerare completamente i tessuti lesionati e tendono a entrare in pupazione con la ferita ancora presente (Maslova et al., 2020; Pereira et al., 2020), limitando la valutazione dei processi di guarigione completa. Pertanto, sebbene il modello di *G. mellonella* sia estremamente utile per lo studio degli effetti dei

trattamenti antimicrobici e della risposta immunitaria generale, futuri studi dovranno validarne l'efficacia in modelli *in vivo* più complessi, come quelli murini, per confermarne la reale traslazionale (Cutuli et al., 2019). Ulteriori ricerche e trial clinici saranno necessari per approfondire le modalità con cui i LAB influenzano sia i patogeni sia l'ospite, al fine di chiarire il loro ruolo crescente come trattamento profilattico nelle infezioni da ferita e nelle ustioni, fornendo una valida alternativa agli antibiotici convenzionali.

Attività 3: L'assunzione preventiva per via orale di *Limosilactobacillus fermentum* DMS 34872 risulta protettiva per *Galleria mellonella* nei confronti di patogeni legati al tratto intestinale.

Razionale dello studio

Il tratto gastrointestinale umano ospita una complessa comunità microbica essenziale per il mantenimento dell'omeostasi immunitaria e metabolica, nonché fondamentale per la difesa contro microrganismi patogeni (Rolhion and Chassaing, 2016; Qiu et al., 2022; Ding et al., 2025). Le alterazioni dell'equilibrio microbico sono riconosciute come fattori di rischio per lo sviluppo di patologie infiammatorie e infettive, spesso associate a squilibri dietetici, colonizzazione da parte di microrganismi opportunisti e uso eccessivo o improprio di antibiotici (DeGruttola et al., 2016; Hou et al., 2022b; Shayista et al., 2025). Tale disbiosi indebolisce le difese dell'ospite e compromette l'integrità della barriera intestinale, aumentando la suscettibilità a infezioni sia locali sia sistemiche, con importanti implicazioni cliniche e di sanità pubblica (Wang et al., 2022; Kamel et al., 2024). In questo contesto, i batteri dell'acido lattico (LAB), in particolare le specie appartenenti al genere *Lactobacillus*, hanno suscitato crescente interesse per il loro potenziale profilattico nei confronti della disbiosi intestinale. I LAB sono generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS) dalla Food and Drug Administration (FDA) e dall'European Food Safety Authority (EFSA), e vantano un lungo storico di impiego sicuro in alimenti e integratori fermentati (Spacova et al., 2023). I loro effetti benefici comprendono il ripristino dell'eubiosi intestinale, la modulazione della risposta infiammatoria e la prevenzione della colonizzazione patogena attraverso meccanismi quali l'esclusione competitiva, la produzione di sostanze antimicrobiche e la modulazione del sistema immunitario (Bron et al., 2017; Safronova et al., 2024; Shah et al., 2024; Vinayamohan et al., 2024). Sebbene molte di queste proprietà siano state ampiamente documentate *in vitro*, la loro efficacia necessita di conferma mediante modelli *in vivo* in grado di riprodurre accuratamente le condizioni fisiologiche dell'ospite, come raccomandato dalle linee guida internazionali (Cutuli et al., 2019, 2021; Petronio Petronio et al., 2020; Isenring et al., 2023; Vergalito et al., 2024). I modelli murini sono considerati fondamentali a questo scopo; tuttavia, il loro impiego risulta spesso limitato da problematiche etiche, elevati costi e lunghi tempi sperimentali (Binda et al., 2020;

Loewa et al., 2023; Teng et al., 2025). Per tali ragioni, i modelli preclinici alternativi, come quelli basati sugli insetti, offrono un approccio più eticamente sostenibile per lo screening preliminare di ceppi probiotici promettenti. In particolare, le larve di *G. mellonella* si sono affermate come un utile modello preclinico *in vivo*, grazie al loro sistema immunitario innato ben conservato, alla risposta dose-dipendente alle infezioni microbiche e alla possibilità di valutare rapidamente parametri biologici chiave quali sopravvivenza, carica patogena, stress ossidativo ed espressione genica di marcatori immunitari (Desbois and Coote, 2011; Sheehan and Kavanagh, 2017; Cutuli et al., 2019; Dinh et al., 2021; Maslova et al., 2023). Alla luce di ciò, il presente studio ha impiegato la somministrazione orale di *Limosilactobacillus fermentum* DSM 34872 (L3), un ceppo isolato dal latte materno umano, per valutarne il potenziale profilattico nei confronti di patogeni intestinali quali *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ed *Enterococcus faecalis*. *S. Typhimurium* è un patogeno enterico ben noto, responsabile di gastroenteriti spesso associate a focolai di origine alimentare, caratterizzate da infiammazione intestinale acuta e diarrea. Al contrario, *E. faecalis*, commensale dell'intestino, è un patogeno opportunista in grado di causare infezioni delle vie urinarie, batteriemia, endocardite, nonché di alterare l'equilibrio microbico intestinale e indurre infezioni sistemiche, in particolare in soggetti immunocompromessi o sottoposti a trattamenti antibiotici (Vergalito et al., 2018; Chandra et al., 2022; Jahan et al., 2022; Aleksandrowicz et al., 2023; Chen et al., 2024; Petrone et al., 2024). La scelta della via di somministrazione orale riveste un'importanza particolare poiché riproduce l'assunzione enterica naturale dei probiotici, consentendo una valutazione fisiologicamente significativa dei loro effetti preventivi e immunomodulatori (Menta et al., 2025). Dopo i risultati incoraggianti ottenuti *in vitro*, si è ipotizzato che la somministrazione orale di L3 potesse inibire la proliferazione dei patogeni e modulare la risposta immunitaria innata. Per verificarlo, le larve di *G. mellonella* sono state infettate con *S. Typhimurium* ed *E. faecalis*, e sono stati analizzati parametri quali la sopravvivenza larvale, la melanizzazione e l'espressione di geni chiave associati al sistema immunitario (*dorsal*, *relish*, *gallerimycin* e *gloverin*) sia a livello intestinale sia nell'emolinfa (Lange et al., 2018; Sarvari et al., 2020; Smith and Casadevall, 2021; Guarnieri et al., 2024, 2025). Questa duplice analisi ha permesso di indagare gli effetti immunomodulatori locali e sistemici (Huang et al., 2020; Admella and Torrents, 2023), confermando la rilevanza fisiologica e l'efficacia del modello di *G. mellonella* alimentata forzosamente come strumento eticamente sostenibile per la fase iniziale di screening delle attività antibatteriche e immunomodulatorie dei LAB.

Una rappresentazione schematica del disegno sperimentale è riportata nella Figura Supplementare 1.

Saggio di sovrapposizione antimicrobica (overlay assay)

Il test di attività antimicrobica overlay assay è stato eseguito secondo la procedura descritta nel nostro precedente studio (Guarnieri et al., 2024), basato sul metodo di Hossain et al. (Hossain et al., 2022). Le dimensioni degli aloni di inibizione rappresentano la media di tre repliche indipendenti; un esempio rappresentativo è riportato in Figura 1.

Figura 1. Attività antimicrobica in vitro di L3 contro E. faecalis.



Preparazione degli inoculi

Le colture notturne cresciute in brodi MH e MRS sono state centrifugate e risospese in soluzione fisiologica fino a raggiungere una densità ottica (OD) di 0,15 a 600 nm (Perkin Elmer Wallac Victor 3 1420 Multilabel), corrispondente a $2,6 \pm 0,2 \times 10^8$ CFU/ml per St, $2,8 \pm 0,2 \times 10^8$ CFU/ml per Ef e $2,1 \pm 0,2 \times 10^7$ CFU/ml per L3.

Somministrazione orale (gavage) di G. mellonella

Diluizioni seriali di tutti gli inoculi batterici (10^3 - 10^6 CFU/mL) sono state somministrate per via orale come segue: per facilitare la somministrazione, le larve di *G. mellonella* sono state brevemente immobilizzate in freezer per circa 3 minuti. La somministrazione orale è stata

effettuata mediante siringa per insulina da 0,5 ml, dotata di ago da 0,33 mm × 12,7 mm. Un singolo volume di 10 µl della sospensione di test è stato delicatamente somministrato nella cavità orale di ciascuna larva, secondo la procedura descritta da Ramarao et al. (Ramarao et al., 2012).

Dopo la somministrazione, le larve sono state incubate a 35 °C e monitorate a intervalli regolari per la valutazione della sopravvivenza e delle risposte fisiologiche.

Gruppi sperimentali di *G. mellonella* per la somministrazione orale

Il protocollo sperimentale ha previsto un disegno a somministrazione forzata per valutare gli effetti profilattici del ceppo L3 contro l'infezione da St ed Ef, come illustrato nella Figura Supplementare 1.

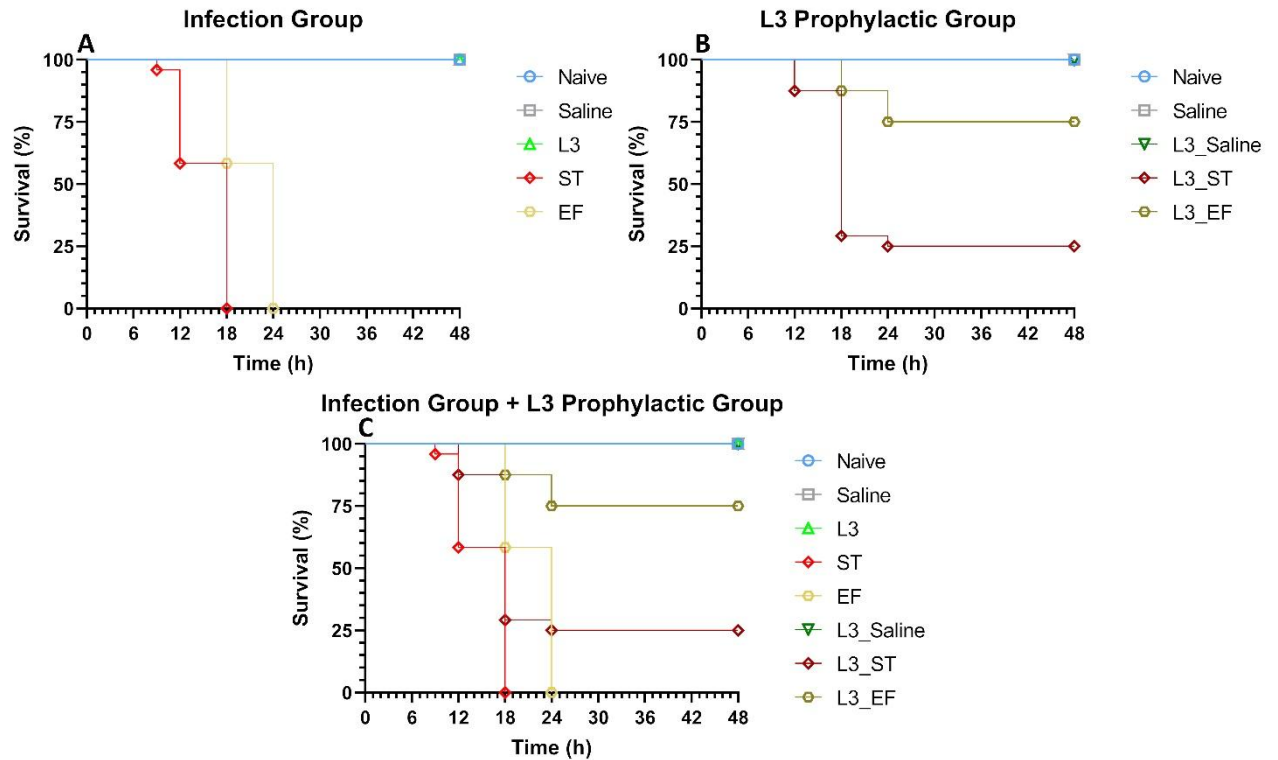
- Gruppo Naive: 30 larve non trattate.
- Gruppo di infezione (IG): 108 larve suddivise in 4 gruppi di trattamento (27 larve per gruppo) e alimentate forzatamente con: soluzione fisiologica, L3, St ed Ef.
- Gruppo profilattico (LPG): 90 larve (30 per gruppo), preventivamente trattate oralmente con L3, successivamente esposte a tre diverse condizioni: soluzione fisiologica, St ed Ef, per valutare l'effetto profilattico del ceppo L3.

Sopravvivenza e punteggio di melanizzazione (MS) di *G. mellonella*

Sopravvivenza

Tutti i gruppi di larve di *G. mellonella* sono stati incubati in piastre Petri sterili a 35 °C in completa oscurità. Le larve sono state distribuite in 8 gruppi, come descritto nel paragrafo 2.8. La sopravvivenza è stata monitorata a intervalli regolari: ogni 2 ore durante le prime 24 ore e successivamente ogni 6 ore fino a 48 ore. Le larve sono state considerate morte in assenza di risposta alla stimolazione fisica e/o in presenza di segni visibili di melanizzazione. In base ai risultati delle curve di sopravvivenza (Figura 2), le concentrazioni di St, Ef e L3 sono state selezionate per gli esperimenti successivi.

Figura 2. Curve di sopravvivenza delle larve di *Galleria mellonella* sottoposte a differenti condizioni sperimentali nel tempo: IG (A), LPG (B) e IG+LPG (C). Le larve non trattate (Naive), trattate con soluzione fisiologica (Saline), con *Lactobacillus fermentum*, oppure infettate con *Salmonella Typhimurium* o *Enterococcus faecalis*, con o senza trattamento profilattico con L3. La sopravvivenza è stata monitorata fino a 72 ore post-infezione. Ogni curva rappresenta la media cumulativa di tre esperimenti indipendenti (n = 30 larve per gruppo). Le differenze statistiche tra i gruppi sono state determinate mediante test log-rank (Mantel-Cox), come indicato nel grafico.



Punteggio di melanizzazione

La risposta immunitaria dell'ospite in *G. mellonella* è caratterizzata dalla formazione di noduli di melanina, macroscopicamente visibili come depositi pigmentati brunastrì. Per valutare quantitativamente la progressione dell'infezione, la cinetica di sviluppo dei noduli melanici è stata monitorata a temperatura costante (35 °C). Tutte le larve sono state osservate a intervalli di 6 ore per registrare sopravvivenza, attività e grado di melanizzazione, seguendo i protocolli standardizzati descritti da Torres et al. e Loh et al. (Loh et al., 2013; Torres et al., 2020). I dati raccolti (Tabella 1) forniscono un quadro complessivo della risposta fisiologica e immunologica dell'ospite alla challenge infettiva.

Estrazione dell'RNA, amplificazione del cDNA ed espressione genica mediante qRT-PCR

Quattro ore dopo la somministrazione forzata, le larve di tutti i gruppi (Naive, IG e LPG) sono state anestetizzate a 4 °C per 10 minuti e successivamente processate. La parte distale dell'addome è stata rimossa con una lama chirurgica sterile (Swann Morton Limited, Sheffield S6 2BJ, Inghilterra), e l'emolinfa e l'intestino sono stati raccolti in provette Eppendorf da 1,5 ml, mantenute sul ghiaccio per prevenire la melanizzazione (Moya-Andérico et al., 2020). Inoltre, a 24 ore dal trattamento profilattico con L3, le larve del gruppo LPG sono state nuovamente processate seguendo la stessa procedura. L'estrazione dell'RNA è stata effettuata seguendo il protocollo descritto nel TRIzol Reagent User Guide (Invitrogen, Waltham, MA, USA). La retrotrascrizione è stata condotta utilizzando il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™) con inibitore RNasi, secondo le istruzioni del produttore. Le analisi di qRT-PCR sono state eseguite con PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) seguendo il protocollo del produttore, utilizzando il sistema Rotor-Gene Q (Qiagen), con temperatura di annealing a 60 °C per 15 s per 35 cicli, seguita dall'analisi della curva di melting (68-95 °C). Tutte le reazioni di qRT-PCR hanno impiegato primer specifici per i geni delle peptidi antimicrobiche (AMPs) *gallerimycin* e *gloverin*, e per i fattori di trascrizione *relish* e *dorsal*, come riportato nella Tabella 2. I risultati sono stati normalizzati rispetto al gene costitutivo Elongation Factor 1-Alpha (EF1) e presentati come valori relativi rispetto alle larve Naive (non trattate). Le variazioni di espressione genica sono state espresse secondo il metodo $\Delta\Delta CT$ (de Melo et al., 2013; Sarvari et al., 2020). Per ogni condizione sperimentale e punto temporale, tre larve sono state combinate per costituire una replica biologica (BR). Da ciascuna BR sono state eseguite tre repliche tecniche (TR) mediante RT-qPCR, distribuite come segue: Naive = 1 BR e 3 TR; IG = 4 BR e 12 TR; LPG = 6 BR e 18 TR (Fallon et al., 2012; Arias et al., 2020). Per garantire trasparenza, il dataset grezzo completo (valori Ct) è stato reso pubblicamente disponibile al seguente indirizzo: 10.6084/m9.figshare.29674325.

Tabella 2. Elenco dei primer utilizzati (qRT-PCR).

Gene	Descrizione del gene	Accession number (mRNA)	ID LOC	Sequenza primer (5' a 3')	Referenze
<i>Dorsal</i>	proteina della polarità embrionale <i>dorsal</i>	XM_052899051.1	LOC113512577	Fw: CGACGAATTTCTACCTGTAAACC Rv: CACCAAACCTTTACTCGACATTT	(Sarvari et al., 2020)
<i>Rel</i>	<i>relish</i>	XM_052893440.1	LOC113515637	Fw: TCCAAAAAGCACCCCTACAATCG Rv: GCACTTCGTAGCTCACATCTC	(Sarvari et al., 2020)
<i>gallerimycin</i>	<i>gallerimycin-like</i>	XM_026909420.3	LOC113523440	Fw: AACCATCACCGTCAAGCCA Rv: TCGAAGACATTGACATCCATTGA	(Sarvari et al., 2020)
<i>gloverin</i>	<i>gloverin</i>	XM_026909162.3	LOC113523269	Fw: AGATGCACGGTCCTACAG Rv: GATCGTAGGTGCCTTGTG	(Melo et al., 2013)
<i>eEF1alpha1</i>	Fattore di elongazione 1-alpha	XM_026903443.1	LOC113518486	Fw: AACCTCCTTACAGTGAATCC Rv: ATGTTATCTCCGTGCCAG	(Melo et al., 2013)

Risultati

Saggio di sovrapposizione antimicrobica (Overlay assay)

L. fermentum ha mostrato attività antibatterica *in vitro*, producendo aloni di inibizione di $22,0 \pm 0,7$ mm contro *S. Typhimurium* e $18,0 \pm 0,3$ mm contro *E. faecalis*.

Sopravvivenza e punteggio di melanizzazione (Melanization Score, MS)

La somministrazione profilattica del ceppo L3 migliora la sopravvivenza di *Galleria mellonella*

I dati relativi ai tassi di sopravvivenza sono riportati in Figura 2. Nei gruppi L3 e nei controlli (Naive e Saline) è stata osservata una sopravvivenza del 100%, mentre l'infezione nei gruppi IG causata da *St* ed *Ef* ha determinato una mortalità totale delle larve rispettivamente a 18 e 24 ore (Figura 2A). Nel gruppo profilattico (LPG, Figura 2B), il gruppo L3_Ef ha mostrato una sopravvivenza del 75%, L3_St del 25%, mentre L3_Saline ha mantenuto il 100% di sopravvivenza. L'analisi di sopravvivenza (Tabella 3) non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi di controllo: Naive vs Saline ($p = 1,00$), Naive vs L3 ($p = 1,00$) e Saline vs L3 ($p = 1,00$), indicando che né il trattamento con L3 né con Saline hanno influenzato la vitalità delle larve. Il confronto tra i gruppi IG ha mostrato una letalità significativamente più elevata nel gruppo *St* rispetto al gruppo *Ef* ($p \leq 0,001$). Confrontando L3 con i gruppi infetti, L3 vs *St* ($p \leq 0,001$) e L3 vs *Ef* ($p \leq 0,001$) hanno entrambe mostrato differenze altamente significative. La somministrazione profilattica di L3 prima dell'infezione ha migliorato in modo significativo la sopravvivenza: *St* vs L3_St ($p \leq 0,001$) e *Ef* vs L3_Ef ($p \leq 0,001$). Il confronto diretto tra L3_St e L3_Ef ha evidenziato un vantaggio statisticamente significativo di L3 contro *Ef* ($p \leq 0,001$). All'interno del gruppo profilattico (LPG), L3_Saline ha mostrato sopravvivenza significativamente superiore rispetto a L3_St ($p \leq 0,001$) e L3_Ef ($p \leq 0,001$); inoltre, la sopravvivenza di L3_Ef è risultata significativamente maggiore rispetto a L3_St ($p \leq 0,001$). La concentrazione responsabile dell'inibizione, indicata dalle curve di sopravvivenza, è stata selezionata per il monitoraggio a 48 ore: nessuna mortalità per L3, $2,6 \pm 0,2 \times 10^5$ CFU/ml per *St* e $2,8 \pm 0,2 \times 10^5$ CFU/ml per *Ef*.

Tabella 3. Confronti a coppie delle stime di sopravvivenza calcolate mediante il metodo di Kaplan-Meier. La significatività statistica è stata determinata utilizzando il test del log-rank.

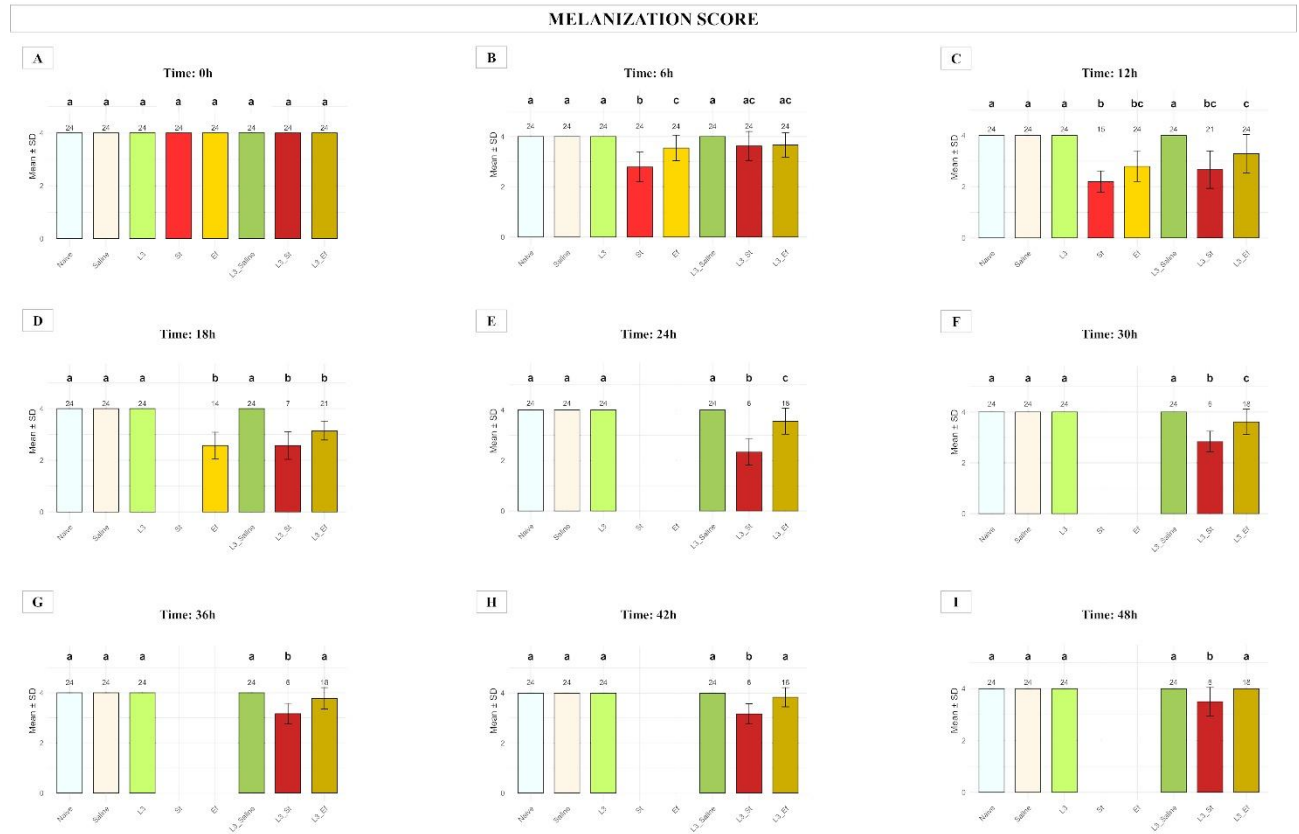
Matrice delle Pairwise Comparisons							
Gruppo	Ef	L3	L3_Ef	L3_Saline	L3_St	Naive	Saline
Ef	1.0000	≤ 0.0001	≤ 0.0001	1.0000	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001
L3	≤ 0.0001	1.0000	1.0000	≤ 0.0001	1.0000	1.0000	≤ 0.0001
L3_Ef	≤ 0.0001	1.0000	1.0000	≤ 0.001	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.0001
L3_Saline	1.0000	≤ 0.0001	≤ 0.001	1.0000	1.0000	1.0000	≤ 0.0001
L3_St	≤ 0.0001	1.0000	≤ 0.05	1.0000	1.0000	≤ 0.0001	≤ 0.01
Naive	≤ 0.0001	1.0000	≤ 0.05	1.0000	≤ 0.0001	1.0000	≤ 0.0001
Saline	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.0001	≤ 0.01	≤ 0.0001	1.0000

Dinamiche della risposta di melanizzazione nelle diverse condizioni sperimentali

Al tempo iniziale (0 ore; Figura 3A), tutti i gruppi sperimentali hanno mostrato un punteggio di melanizzazione (MS) uniformemente elevato ($MS = 4$), senza differenze significative tra i gruppi ($p > 0,05$). I gruppi Naive, Saline e L3 hanno mantenuto valori costantemente alti ($MS = 4$) durante tutto l'arco temporale di osservazione (fino a 48 ore), senza differenze significative in nessun tempo di misurazione ($p > 0,05$) (Figura 3). Alle 6 e 12 ore, i gruppi infetti con *St* o *Ef* hanno mostrato una melanizzazione significativamente ridotta rispetto ai gruppi Naive, Saline e L3 ($p \leq 0,05$; Figura 3B, C). Il gruppo *St* ha evidenziato un calo marcato già a 6 ore (punteggio medio < 3), con ulteriore diminuzione a 12 ore (< 2), raggiungendo il 100% di mortalità a 18 ore (Figura 3A-D). Al contrario, il gruppo *Ef* ha mostrato un declino più graduale, mantenendo $MS > 2$ a 12 ore e raggiungendo il 100% di mortalità a 24 ore (Figura 3A-E). In entrambi i tempi di 6 e 12 ore, i valori di MS sono risultati significativamente inferiori in *St* rispetto a *Ef* ($p \leq 0,05$) (Figura 3B, C). Il gruppo L3 ha mantenuto valori di melanizzazione prossimi a 4 in tutti i tempi (0-48 ore), significativamente più alti rispetto ai gruppi infetti *St* ed *Ef* a partire da 6 ore ($p \leq 0,05$) (Figura 3). Il pretrattamento profilattico con L3 ha migliorato in modo significativo la melanizzazione e la sopravvivenza in entrambe le infezioni. Alle 6 e 12 ore (Figura 3B, C), il gruppo L3_St ha mostrato valori di MS significativamente più elevati rispetto al gruppo *St* ($p \leq 0,05$). A 18 ore (Figura 3D), quando tutte le larve *St* erano morte, le larve L3_St hanno mantenuto punteggi prossimi a 3, con sopravvivenza parziale. A 24 ore (Figura 3E), le larve L3_St mostravano ancora melanizzazione misurabile (media > 2),

indicando sopravvivenza prolungata e ritardo nel collasso immunitario rispetto a *St* ($p \leq 0,001$). Nel gruppo L3_*St*, si è inoltre osservato un recupero progressivo del MS tra 24 e 48 ore (Figura 3E-I). Analogamente, nei gruppi L3_*Ef*, i valori di melanizzazione alle 6 e 12 ore (Figura 3B, C) erano significativamente più alti rispetto a *Ef* ($p \leq 0,05$). A 24 ore (Figura 3E-I), le larve L3_*Ef* mantenevano $MS > 2$ e continuavano a sopravvivere fino a 48 ore, mostrando anch'esse un recupero del MS tra 24 e 48 ore. In tutti i tempi corrispondenti, non sono state riscontrate differenze significative di melanizzazione tra i gruppi L3_*St* e L3_*Ef* ($p > 0,05$) (Figura 3). Infine, il gruppo L3_*Saline* ha mostrato un andamento sovrapponibile a Naive, Saline e L3, mantenendo $MS \approx 4$ in tutti i tempi ($p > 0,05$) (Figura 3). È importante sottolineare che i valori di MS in L3_*Saline* erano significativamente più alti rispetto ai gruppi L3_*St* e L3_*Ef* in tutti i tempi sovrapposti ($p \leq 0,05$) (Figura 3).

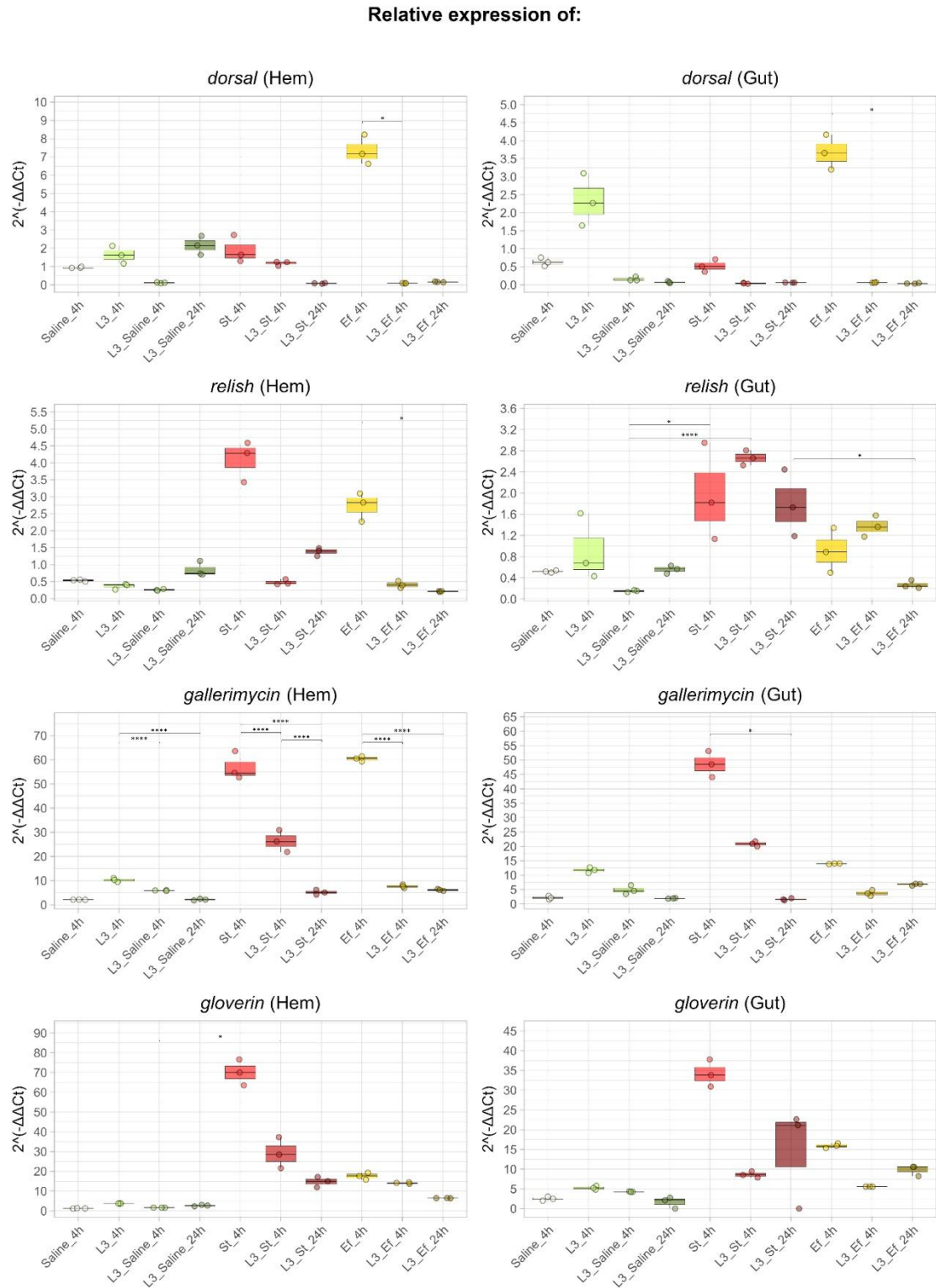
Figura 3. Punteggi di melanizzazione delle larve di *Galleria mellonella* in nove intervalli temporali: 0 (A), 6 (B), 12 (C), 18 (D), 24 (E), 30 (F), 36 (G), 42 (H) e 48 (I) ore dopo il trattamento, in differenti condizioni sperimentali. Le larve sono state alimentate forzatamente con: Naive (non trattate), Saline, L3, L3_Saline (pre-trattate con L3, poi con soluzione fisiologica), St, L3_St (pre-trattate con L3, poi con St), Ef e L3_Ef (pre-trattate con L3, poi con Ef). I numeri riportati sopra le barre indicano il numero di larve sopravvissute a ciascun intervallo temporale. Le differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali sono indicate da lettere differenti (a, b, c; $p < 0,05$).



Analisi dei livelli di espressione dell'mRNA dei geni dorsal, relish, gallerimycin e gloverin nell'emolinfa e nell'intestino di Galleria mellonella

Per studiare la risposta immunitaria delle larve di *G. mellonella* alle diverse condizioni sperimentali e i meccanismi molecolari sottostanti, sono stati analizzati i livelli di espressione di quattro geni - *dorsal*, *relish*, *gallerimycin* e *gloverin* - coinvolti nei principali pathway immunitari e nella produzione di peptidi antimicrobici (AMPs), in due compartimenti distinti: emolinfa e intestino. Di seguito e in Figura 4 sono riportati esclusivamente i risultati statisticamente significativi. I dataset completi sono disponibili nel repository dei dati.

Figura 4. Livelli di espressione relativa dei geni dorsal, relish, gallerimycin e gloverin nell'intestino e nell'emolinfa delle larve di *Galleria mellonella*, 4 e 24 ore dopo l'alimentazione forzata in differenti condizioni sperimentali: Saline, L3, St, Ef, L3_Saline, L3_St e L3_Ef. L'espressione genica è stata quantificata mediante RT-qPCR utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. I dati sono presentati come media $\pm$ deviazione standard, mediana e [Q1 = primo quartile - Q3 = terzo quartile]. Le differenze statisticamente significative tra le condizioni sperimentali sono indicate da lettere differenti (a, b; $p < 0,05$).



Gene: *dorsal*

Il gene *dorsal* ha mostrato una marcata modulazione in entrambi i compartimenti analizzati. Nell'emolinfa, l'espressione è risultata significativamente ridotta in L3_Ef_4h rispetto a Ef_4h ($p < 0,01$). Nell'intestino, differenze significative sono state osservate tra Ef_4h e L3_Ef_24h ($p < 0,05$). Complessivamente, *dorsal* ha mostrato livelli più elevati durante l'infezione acuta e valori inferiori nei gruppi pretrattati con L3.

Gene: *relish*

Per il gene *relish*, è stato osservato un chiaro aumento dell'espressione nei gruppi infetti rispetto ai controlli e ai gruppi L3. Nell'emolinfa, l'espressione era significativamente più alta in St_4h ed Ef_4h. Nell'intestino, *relish* è risultato sovraespresso nei trattamenti con St rispetto ai controlli Saline e L3.

Gene: *gallerimycin*

Il gene *gallerimycin* ha mostrato variazioni significative in diverse condizioni sperimentali. Nell'emolinfa, si è osservata una marcata sovraregolazione in St_4h ed Ef_4h rispetto a Saline_4h.

Nei gruppi pretrattati con L3, l'espressione è risultata significativamente ridotta rispetto ai gruppi infetti St ed Ef ($p < 0,001$). Nell'intestino, la riduzione più evidente è stata osservata tra St_4h e L3_St_24h ($p < 0,01$).

Gene: *gloverin*

Il gene *gloverin* ha mostrato una sovraregolazione in seguito a infezione con St ed Ef. Sia nell'emolinfa che nell'intestino, l'espressione è risultata più elevata nei gruppi St ed Ef rispetto ai gruppi L3.

Confronto tra i livelli di espressione mRNA in intestino ed emolinfa

La Tabella 4 riassume i pattern comparativi di espressione dei geni correlati all'immunità nei due compartimenti, emolinfa e intestino, nelle diverse condizioni sperimentali. Sono state osservate differenze compartimentali significative per tutti e quattro i geni target. L'espressione di *dorsal* ha mostrato una modulazione più marcata nell'emolinfa, in particolare in L3_Ef_24h ($p \leq 0,001$) ed Ef_4h ($p \leq 0,01$). Al contrario, *relish* ha evidenziato differenze significative in

più condizioni (St_4h, L3_St_4h, L3_Ef_4h). Per i geni effettrici *gallerimycin* e *gloverin*, sono state riscontrate variazioni compartimentali significative, con espressione più elevata nell'emolinfa, in particolare in L3_Ef_4h ($p \leq 0,01$) e L3_Saline_4h ($p \leq 0,001$).

Tabella 4. Analisi comparativa dell'espressione genica in condizioni differenti nell'intestino e nell'emolinfa. Le differenze statisticamente significative tra intestino ed emolinfa sono indicate con asterischi ($p \leq 0,05$: *, $p \leq 0,01$: **, $p \leq 0,001$: ***)

Gene	Condizione	Significatività
<i>dorsal</i>	Ef_4h	**
<i>dorsal</i>	L3_St_4h	**
<i>dorsal</i>	L3_Saline_24h	*
<i>dorsal</i>	L3_Ef_24h	***
<i>relish</i>	St_4h	*
<i>relish</i>	Ef_4h	**
<i>relish</i>	L3_St_4h	***
<i>relish</i>	L3_Ef_4h	**
<i>relish</i>	L3_Saline_4h	**
<i>gallerimycin</i>	L3_Ef_4h	**
<i>gallerimycin</i>	L3_St_24h	*
<i>gloverin</i>	Saline_4h	*
<i>gloverin</i>	St_4h	**
<i>gloverin</i>	L3_St_4h	*
<i>gloverin</i>	L3_Saline_4h	***

Discussione

La crescente prevalenza della disbiosi intestinale e delle sue conseguenze sistemiche evidenzia l'urgente necessità di strategie preventive che siano sicure, efficaci e facilmente applicabili. Sebbene molte terapie si concentrino sulla gestione delle infezioni una volta insorte, l'attenzione verso interventi di tipo profilattico, in particolare attraverso l'impiego di probiotici selezionati, rappresenta un approccio promettente per sostenere le difese naturali dell'ospite e mantenere l'equilibrio microbico (Alagiakrishnan et al., 2024; Safronova et al., 2024; Vinayamohan et al., 2024). In questo contesto, abbiamo studiato *Limosilactobacillus fermentum* (L3), un batterio lattico isolato dal latte materno umano, dimostrando che la sua somministrazione orale profilattica incrementa in modo significativo la sopravvivenza e il punteggio di melanizzazione delle larve di *G. mellonella* infettate con *Salmonella* Typhimurium (St) ed *Enterococcus faecalis* (Ef). I nostri risultati supportano il ruolo funzionale di L3 nel promuovere la salute dell'ospite in un modello preclinico *in vivo* alternativo, come evidenziato dalla capacità del ceppo di inibire la crescita patogena e di modulare le risposte immunitarie innate sia a livello locale (intestinale) che sistemico (emolinfa). In primo luogo, l'attività antimicrobica *in vitro* del ceppo L3 è stata valutata mediante overlay assay, un metodo di screening preliminare comunemente impiegato per analizzare le interazioni tra microrganismi (Hockett and Baltrus, 2017; Riera et al., 2017; Hossain et al., 2022). Tale saggio consente di rilevare principalmente l'attività di metaboliti antimicrobici diffusibili, come acidi organici e batteriocine (Maricic and Dawid, 2014). È noto che i LAB producono sostanze in grado di interferire con i processi fisiologici dei patogeni, quali la fermenticina prodotta da ceppi di *L. fermentum* (Kaur et al., 2013), la plantaricina di *Lactobacillus plantarum* (Righetto et al., 2023) e la ben nota reuterina di *L. reuteri*, tutte molecole dotate di notevole attività antimicrobica (Asare et al., 2020). I nostri risultati hanno evidenziato un effetto antagonista più marcato contro St rispetto a Ef, come indicato da un diametro di inibizione maggiore. Tuttavia, negli esperimenti *in vivo* su larve di *G. mellonella*, L3 ha mostrato una maggiore efficacia nel migliorare la sopravvivenza contro Ef rispetto a St (Figura 2), mettendo in luce le ben note discrepanze tra esperimenti *in vitro* e *in vivo* (Scalfaro et al., 2017; Venditti et al., 2021; Petronio Petronio et al., 2022; Guarnieri et al., 2024; Fneish et al., 2025). Tali differenze possono essere attribuite a fattori quali la capacità di adesione intestinale, la modulazione immunitaria e le strategie di evasione specifiche dei patogeni. Inoltre, *E. faecalis*, commensale umano, può risultare più sensibile alla modulazione immunitaria indotta da L3, mentre *S. Typhimurium*, in quanto patogeno, può attuare meccanismi di evasione che riducono l'efficacia antimicrobica

del ceppo LAB (Jahan et al., 2022; Lam et al., 2022). Di conseguenza, l'affidabilità dei test *in vitro* risulta limitata quando si tratta di valutare le interazioni ospite-patogeno (Salas-Jara et al., 2016; Burkhardt et al., 2019; Guarnieri et al., 2024). Durante lo studio, per monitorare lo stato di salute delle larve, oltre ai dati di sopravvivenza è stato registrato il punteggio di melanizzazione (MS), un indicatore dinamico che fornisce informazioni in tempo reale. La melanizzazione in *G. mellonella* è mediata dalla cascata della profenolossidasi (proPO), che culmina nella sintesi di melanina nei siti di infezione o lesione. Questo processo contribuisce non solo all'uccisione diretta dei microrganismi attraverso l'incapsulamento e la produzione di intermedi ossidativi, ma funge anche da indicatore visibile dell'attivazione immunitaria e della gravità dell'infezione (Smith, 2022; Marena et al., 2025). All'inizio della registrazione, tutte le larve presentavano un MS uniforme pari a 4, indice di un sistema immunitario non stressato. Nei gruppi infettati (St ed Ef), tuttavia, i punteggi sono diminuiti drasticamente entro 6 ore (media < 3), probabilmente a indicare la fase acuta dell'infezione e un sovraccarico del sistema immunitario. Al contrario, le larve pretrattate con L3 hanno mostrato un andamento nettamente differente: il gruppo L3_Saline ha mantenuto valori stabili nel tempo, confermando che il batterio non interferisce con la capacità di melanizzazione. Nei gruppi infetti pre-esposti a L3, il calo di MS è risultato significativamente attenuato: a 6 e 12 ore i punteggi sono rimasti costantemente più elevati rispetto ai controlli infettati non trattati. Ciò suggerisce che L3 aumenti la resilienza del sistema proPO, ritardando l'insorgenza del collasso immunitario durante l'infezione. È inoltre degno di nota il comportamento nelle fasi tardive: mentre le larve infette non pretrattate hanno mantenuto valori di MS bassi, quelle pretrattate con L3 hanno mantenuto punteggi superiori a 2 a 24 ore e hanno mostrato segni di recupero a 48 ore. In altre parole, L3 non solo stabilizza la melanizzazione nella fase acuta, ma favorisce anche il ripristino della funzionalità immunitaria nel tempo. Complessivamente, l'MS emerge come un indicatore sensibile dell'equilibrio tra attivazione ed esaurimento immunitario. Il pretrattamento profilattico con L3 sostiene una risposta di melanizzazione controllata, efficace nel limitare l'infezione ma priva di eccessiva iperattivazione, evidenziando il valore dell'MS come biomarcatore precoce sia della gravità dell'infezione che dell'efficacia profilattica (Loh et al., 2013; Torres et al., 2020). Infine, è stata valutata l'attività immunomodulante di L3 sul sistema immunitario mediante analisi qRT-PCR dei geni *dorsal*, *relish*, *gallerimycin* e *gloverin*, in due compartimenti biologici distinti, emolinfa e intestino, al fine di esplorare gli effetti sistemici e locali. Pur riconoscendo che l'analisi di soli quattro geni immuno-correlati non può cogliere appieno la complessità della risposta dell'ospite, questi geni sono stati selezionati poiché rappresentano marcatori trascrizionali consolidati e frequentemente impiegati delle due

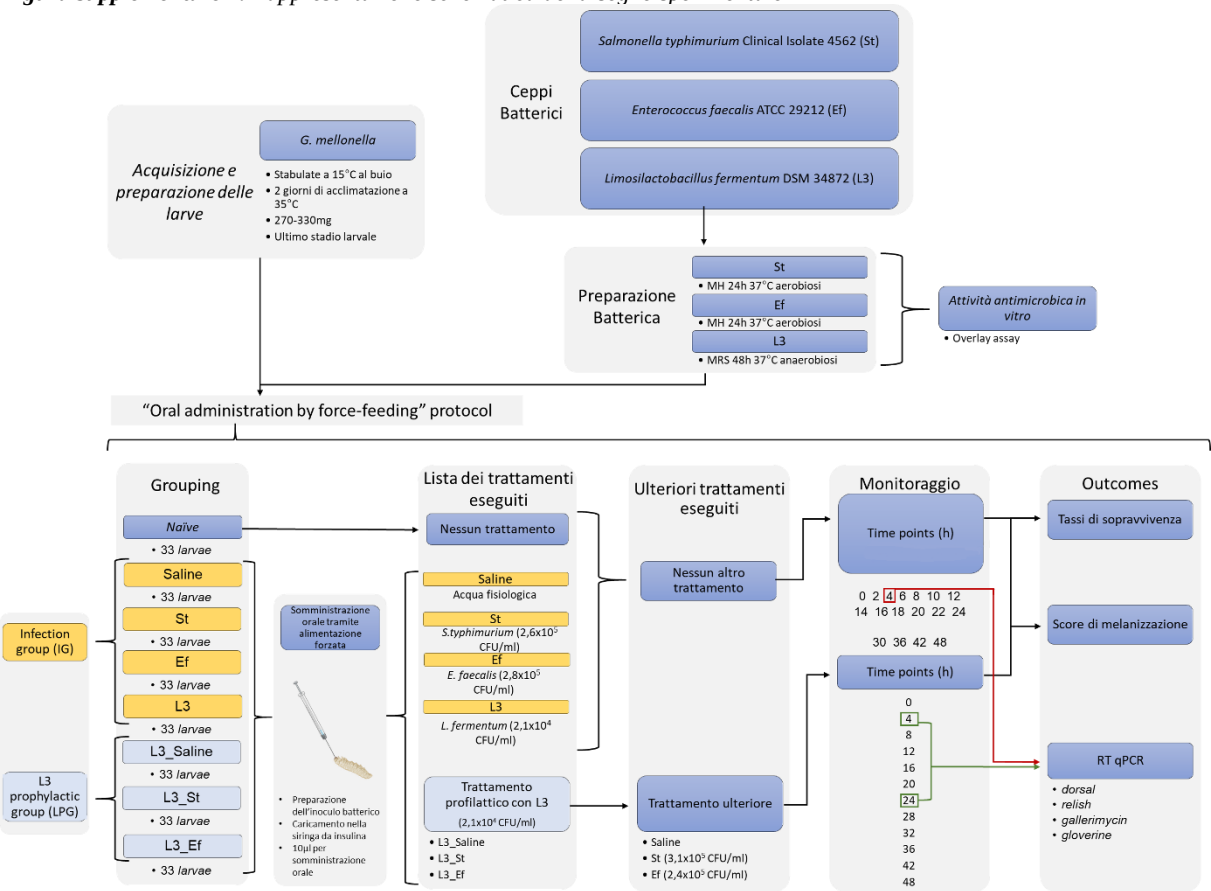
principali vie immunitarie innate in *G. mellonella* (Lange et al., 2018; Sarvari et al., 2020; Smith and Casadevall, 2021; Guarnieri et al., 2024, 2025). *dorsal* e *relish* agiscono come regolatori trascrizionali a monte, mentre *gallerimycin* e *gloverin* rappresentano molecole effettrici a valle (Brown et al., 2009; Tsakas and Marmaras, 2010; Guarnieri et al., 2025). *Dorsal*, ortologo di NF- κ B p65 umano, è il principale fattore di trascrizione della via Toll, tipicamente attivata da batteri Gram-positivi e funghi. *Relish*, omologo di NF- κ B p100, opera nella via IMD, classicamente attivata da batteri Gram-negativi ma implicata anche in risposte immunitarie più ampie. *Gallerimycin* è un peptide tipo defensina con attività antifungina e anti-Gram-positiva, mentre *gloverin* esercita funzioni antimicrobiche più ampie destabilizzando le membrane microbiche, in modo analogo alle catelicidine dei vertebrati (De Gregorio et al., 2002; Sutcliffe and Harrington, 2002; Schuhmann et al., 2003; Hedengren-Olcott et al., 2004; Moorthy et al., 2007; Wang, 2014; Sarvari et al., 2020; Serrano et al., 2023; Guarnieri et al., 2025). I nostri risultati (Figura 4) mostrano che la dinamica trascrizionale di questi geni non segue regole rigidamente specifiche di via, ma manifesta un'elevata plasticità e una regolazione temporale coerente con quanto riportato in altri studi (Pereira et al., 2020; Sarvari et al., 2020; Guarnieri et al., 2024, 2025). *Dorsal* risulta fortemente sovraespresso nella fase iniziale dell'infezione da Ef, ma notevolmente attenuato nelle larve pretrattate con L3, suggerendo che L3 possa modulare al ribasso l'attivazione mediata da Toll per prevenire risposte infiammatorie eccessive. *Relish* viene invece indotto da entrambi i patogeni, indicando un ruolo sistemico più ampio, ma la sua espressione in fase tardiva si riduce significativamente dopo pretrattamento profilattico con L3, coerentemente con un ruolo nella risoluzione immunitaria. L'analisi comparativa ha mostrato livelli di *relish* più elevati nell'intestino delle larve pretrattate con L3, suggerendo uno spostamento verso una risposta immunitaria locale piuttosto che sistemica. In linea con queste variazioni a monte, *gallerimycin* e *gloverin* sono risultate fortemente indotte nelle prime ore post-infezione, in particolare nell'emolinfa, ma tale induzione è risultata significativamente ridotta in seguito al pretrattamento profilattico con L3. È interessante notare che, nonostante la minore espressione dei peptidi antimicrobici, la sopravvivenza delle larve è aumentata, suggerendo che una produzione eccessiva o prolungata di AMP possa risultare dannosa a causa di costi metabolici o danni tissutali. Complessivamente, i livelli di espressione genica registrati sottolineano come l'immunità innata di *G. mellonella* sia finemente regolata tra attivazione e tolleranza. Combinando l'analisi di regolatori e di effettori, abbiamo dimostrato che il pretrattamento profilattico con L3 può promuovere uno stato immunitario più equilibrato, sufficiente a controllare l'infezione ma limitato per evitare fenomeni di immunopatologia, come riportato anche in altri studi condotti su modelli murini (Bron et al., 2017; Moya-Andérico et

al., 2020; Upfold et al., 2023; Ferreira et al., 2024; Guarnieri et al., 2025). Oltre ai risultati sperimentali favorevoli, un punto di forza rilevante di questo studio risiede negli approcci metodologici adottati: l'uso della somministrazione orale e del modello preclinico alternativo *G. mellonella*. La somministrazione orale, a differenza dell'iniezione, riproduce la via naturale di assunzione dei LAB e garantisce l'interazione con l'ambiente intestinale, aspetto essenziale per valutare le risposte epiteliali e la competizione microbica (Browne et al., 2013; Rolhion and Chassaing, 2016; Qiu et al., 2022; Kordaczuk et al., 2023; Ding et al., 2025). Tale scelta metodologica è supportata dai recenti risultati di Menta et al. (Menta et al., 2025), che hanno dimostrato come l'efficacia dei probiotici in *G. mellonella* sia fortemente influenzata dalla via di somministrazione. Un ulteriore vantaggio metodologico è rappresentato dalla scelta di *G. mellonella* come modello preclinico alternativo. Numerosi studi hanno evidenziato una forte concordanza tra i dati ottenuti in *G. mellonella* e nei modelli murini, in particolare per quanto riguarda l'efficacia antimicrobica (Desbois and Coote, 2011; Loh et al., 2013; Tsai et al., 2016). Questo insetto rappresenta inoltre un valido sistema di valutazione, consentendo l'analisi di tassi di sopravvivenza e risposte immunitarie in condizioni controllate, economiche ed eticamente sostenibili. Il suo impiego, infatti, è pienamente coerente con i principi delle 3R (Replacement, Reduction e Refinement) nella ricerca animale (Cutuli et al., 2019; Calvillo, 2022), promuovendo un disegno sperimentale più responsabile. Un aspetto che merita attenzione riguarda l'assenza di dati sulla colonizzazione o persistenza di L3 nell'intestino dell'ospite. In *G. mellonella* tali valutazioni sono intrinsecamente limitate, poiché l'ultimo stadio larvale offre una finestra sperimentale ristretta di pochi giorni prima della pupazione (Bugyna et al., 2023). In linea di principio, un monitoraggio a lungo termine sarebbe possibile impiegando stadi larvali precedenti, ma ciò richiederebbe una sostanziale ri-standardizzazione del modello. Va comunque sottolineato che la colonizzazione non è un prerequisito necessario per la definizione di probiotico: secondo le definizioni ampiamente accettate, il criterio essenziale è la dimostrazione di un effetto benefico per l'ospite (Hill et al., 2014). Coerentemente, studi analoghi in *G. mellonella* con obiettivi comparabili si sono concentrati sugli esiti funzionali senza valutare direttamente la persistenza microbica (Venditti et al., 2021; Menta et al., 2025). Un ulteriore punto critico riguarda le caratteristiche intrinseche del microbiota intestinale di *G. mellonella*. A differenza dei mammiferi, questo insetto non possiede una comunità microbica stabile o diversificata; le popolazioni microbiche sono in gran parte transitorie, acquisite dall'ambiente e prive della complessità tipica dei modelli vertebrati (Johnston and Rolff, 2015; Wojda, 2017). Per questa ragione non sono state condotte analisi dettagliate del microbiota dopo somministrazione orale di L3, Ef e St, poiché la rilevanza

traslazionale di tali dati sarebbe limitata (Allonsius et al., 2019; Gooch et al., 2024). L'ultima limitazione riguarda la risposta immunitaria adattativa. *G. mellonella* ne è priva, il che impedisce la valutazione di meccanismi fondamentali quali la memoria immunologica, l'espansione clonale e le risposte antigene-specifiche, che nei vertebrati sono essenziali per una protezione a lungo termine contro i patogeni (Pereira et al., 2018; Cutuli et al., 2019; Ericsson, 2019). In conclusione, i risultati del presente studio supportano *L. fermentum* DSM 34872, isolato dal latte materno umano, come candidato promettente per ulteriori indagini in modelli preclinici avanzati, in particolare murini. Più che sostituire i modelli mammiferi, proponiamo l'impiego di *G. mellonella* come strumento *in vivo* complementare ed ecocompatibile, utile per la selezione preliminare di ceppi di LAB e per ridurre l'uso di vertebrati nelle fasi iniziali dello sviluppo di probiotici. Le ricerche future dovranno pertanto concentrarsi sulla validazione murina dell'attività immunomodulante, sull'analisi della dinamica di colonizzazione intestinale mediante approcci molecolari, su esperimenti di transito gastrointestinale e sulla valutazione delle interazioni ospite-microbiota in condizioni più complesse e fisiologicamente rilevanti.

Materiali supplementari

Figura supplementare 1. Rappresentazione schematica del disegno sperimentale



Attività 4: Isolamento e caratterizzazione delle vescicole extracellulari prodotte da *Limosilactobacillus fermentum*

Razionale dello studio

Le vescicole extracellulari batteriche (BEVs) sono nanostrutture delimitate da un doppio strato lipidico, rilasciate attivamente da numerose specie batteriche, in grado di veicolare un ampio spettro di biomolecole, tra cui proteine, lipidi, acidi nucleici e metaboliti (Kim et al., 2023). Negli ultimi anni, le BEVs sono emerse come elementi chiave nella comunicazione intercellulare e nei processi di interazione tra microrganismi e ospite, assumendo un ruolo centrale sia nei meccanismi di patogenicità sia nei fenomeni di protezione e modulazione immunitaria (Jan, 2017; Kim et al., 2023). Nel contesto dei Lactic Acid Bacteria (LAB), le BEVs hanno recentemente acquisito particolare interesse per il loro possibile coinvolgimento negli effetti benefici attribuiti ai ceppi probiotici (Zhang et al., 2024). A differenza delle cellule batteriche vive, le BEVs possono esercitare attività biologiche in forma “cell-free”, configurandosi come potenziali effettori postbiotici, con implicazioni rilevanti in ambito nutraceutico, farmacologico e biomedico (Zhang et al., 2024; Liu et al., 2025). Studi recenti hanno dimostrato che le BEVs derivate dai LAB possono modulare la risposta immunitaria dell'ospite, interferire con i meccanismi di adesione e formazione del biofilm patogeno e partecipare ai processi di competizione microbica (Liu et al., 2025). Nonostante il crescente interesse verso queste strutture, la produzione, la caratterizzazione fisico-chimica e il contenuto molecolare delle BEVs risultano fortemente ceppo-specifici e dipendenti dalle condizioni di crescita, rendendo necessaria una caratterizzazione sperimentale diretta per ciascun microrganismo di interesse (Hong et al., 2014; Zhang et al., 2024). Alla luce di queste considerazioni, il presente capitolo è stato finalizzato all'isolamento e alla caratterizzazione fisico-chimica delle BEVs prodotte da tre ceppi di *Limosilactobacillus fermentum* (DSM 34871, DSM 34872 e DSM 34873). In particolare, lo studio ha previsto la valutazione della concentrazione e della distribuzione dimensionale mediante Nanoparticle Tracking Analysis, la determinazione del potenziale ζ , la quantificazione del contenuto in DNA, RNA e proteine, nonché l'analisi del profilo proteico mediante SDS-PAGE. Le analisi di identificazione proteica mediante LC-MS/MS sono state avviate ma non sono incluse nella presente tesi in quanto ancora in corso. Nel loro insieme, questi approcci sperimentali sono stati applicati con l'obiettivo di fornire una prima caratterizzazione strutturale e molecolare delle BEVs prodotte

da *L. fermentum*, come base per futuri studi funzionali volti a chiarirne il potenziale ruolo biologico e applicativo.

Condizioni di crescita e preparazione delle colture per la produzione delle BEVs

I ceppi di LAB sono stati seminati su piastre di agar MRS e incubati in condizioni di anaerobiosi mediante l'utilizzo di bustine generatrici di gas Anerogen (Thermo Scientific Diagnostic B.V., Landsmeer, Paesi Bassi) per 48 ore a 37 °C. Da ciascuna piastra è stata selezionata una singola colonia, successivamente inoculata in 14 mL di brodo MRS supplementato con inulina al 2% (p/v) e incubata a 37 °C per 24 ore. Successivamente, 10 mL di questa coltura sono stati trasferiti in 90 mL di nuovo brodo MRS supplementato con inulina al 2% (p/v) e incubati a 37 °C per ulteriori 24 ore. Per l'amplificazione su larga scala, 50 mL di questa coltura sono stati inoculati in 450 mL di brodo MRS supplementato con inulina al 2% (p/v) e incubati a 37 °C per 48 ore. L'inulina (2% p/v) è stata selezionata come supplemento prebiotico sulla base di evidenze precedenti che ne dimostrano la capacità di incrementare la crescita, l'attività metabolica e la vitalità dei ceppi di *Lactobacillus* spp. (Pereira et al., 2023). La crescita batterica è stata monitorata mediante la misurazione della densità ottica a 600 nm (OD₆₀₀), al fine di verificare il raggiungimento della fase esponenziale, considerata ottimale per la produzione e il rilascio delle BEVs (Wen et al., 2023; Park et al., 2025).

Isolamento delle BEVs

Il volume finale di coltura (500 mL) è stato sottoposto a centrifugazione a $2.700 \times g$ per 15 minuti a 4 °C al fine di separare il pellet batterico dal surnatante. Il surnatante è stato successivamente filtrato attraverso membrane in cellulosa da 0,22 µm (Corning, New York, NY, USA) per rimuovere eventuali cellule residue e detriti cellulari. Il surnatante filtrato è stato quindi concentrato fino a un decimo del volume iniziale mediante dispositivi di filtrazione centrifuga Amicon® Ultra-15 con cutoff molecolare di 100 kDa (Merck Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda), seguendo le istruzioni del produttore. Le BEVs sono state successivamente precipitate mediante ultracentrifugazione a $42.000 \times g$ per 3 ore e 30 minuti a 4 °C, utilizzando un'ultracentrifuga Beckman Optima L-90K equipaggiata con rotore a cestello oscillante SW 28 Ti (Beckman Coulter, USA). Il pellet contenente le BEVs è stato delicatamente risospeso in 700 µL di PBS sterile e conservato a -80 °C fino all'utilizzo. La medesima procedura è stata applicata a brodo MRS sterile preventivamente filtrato, al fine di ottenere un controllo negativo privo di vescicole (CTRL-) (Croatti et al., 2022; Li et al., 2024).

Analisi mediante Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

I campioni di BEVs sono stati caratterizzati in termini di distribuzione dimensionale delle particelle e concentrazione mediante Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) utilizzando lo strumento ZetaView® (Particle Metrix, Germania), che combina la microscopia a scattering laser con il tracciamento video delle singole particelle (Croatti et al., 2022; Li et al., 2024). I campioni sono stati diluiti in rapporto 1:10.000 in acqua ultrapura di grado HPLC, al fine di ottenere una concentrazione particellare idonea a rientrare nel range ottimale di rilevazione dello strumento. Le sospensioni diluite sono state quindi caricate nella camera di analisi mediante siringa sterile. Le traiettorie delle singole particelle sono state analizzate per la determinazione del diametro idrodinamico sulla base del moto browniano, mentre la concentrazione particellare è stata calcolata mediante il software dedicato fornito dal produttore, secondo le relative linee guida operative.

Quantificazione di DNA e RNA

DNA e RNA sono stati estratti dai campioni di BEVs utilizzando il reagente TRIzol™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA), seguendo le istruzioni del produttore. In sintesi, i campioni sono stati risospesi in 1 mL di TRIzol™ e incubati per 5 minuti a temperatura ambiente, al fine di consentire la completa dissociazione dei componenti molecolari. Successivamente, sono stati aggiunti 200 µL di cloroformio e i campioni sono stati centrifugati a $12.000 \times g$ per 15 minuti a 4 °C. Dopo la centrifugazione, la miscela si è separata in una fase inferiore fenolo-cloroformio, un'interfase proteica e una fase acquosa superiore contenente l'RNA. Il DNA è stato isolato a partire dall'interfase e dalla fase organica, precipitato con etanolo al 100% (v/v), lavato con citrato di sodio 0.1 M in etanolo al 10% (v/v) e successivamente con etanolo al 75% (v/v). Il pellet di DNA è stato risospeso in 100 µL di NaOH 8 mM ed EDTA 1 mM e successivamente neutralizzato con HEPES 0.1 M (pH 7.0). L'RNA è stato recuperato dalla fase acquosa mediante precipitazione con isopropanolo al 99% (v/v) e successivamente lavato con etanolo al 75% (v/v). Il pellet di RNA è stato risospeso in 30 µL di acqua priva di RNasi contenente EDTA 0.1 mM e incubato per 15 minuti a 55 °C per favorirne la completa solubilizzazione. I campioni di DNA sono stati conservati a -20 °C, mentre i campioni di RNA a -80 °C. La concentrazione degli acidi nucleici è stata determinata mediante spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Analisi proteomiche

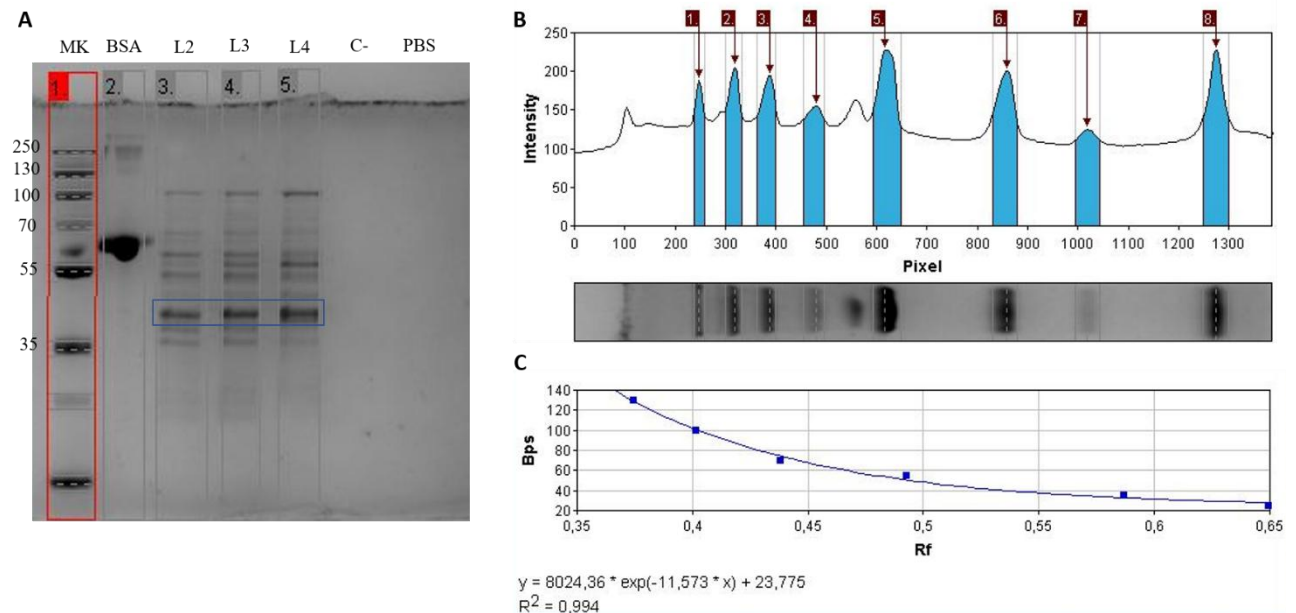
Saggio di Bradford per la determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica totale dei campioni di BEVs è stata determinata mediante il saggio di Bradford utilizzando il reagente Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (450 mL). L'albumina sierica bovina (Bovine Serum Albumin, BSA), alla concentrazione di 0.5 mg/mL, è stata impiegata come standard per la costruzione della curva di calibrazione. L'assorbanza dei campioni è stata misurata a una lunghezza d'onda di 595 nm mediante spettrofotometro UV/VIS (Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, PerkinElmer). La concentrazione proteica è stata quindi calcolata sulla base della curva standard ottenuta da diluizioni seriali dello standard di BSA. Tutte le misurazioni sono state eseguite in duplicato tecnico, al fine di garantire l'accuratezza e la riproducibilità dei dati (Bradford, 1976; Kruger, 1994).

Analisi proteica mediante SDS-PAGE

Le BEVs sono state caratterizzate in termini di composizione proteica mediante analisi SDS-PAGE (Welsh et al., 2024) (Figura 1). A tale scopo, i campioni di BEVs sono stati risospesi in tampone di campione Laemmli contenente β -mercaptoetanol al 2% e sottoposti a denaturazione termica mediante incubazione a 99 °C per 3 minuti. I campioni sono stati quindi caricati su un gel di poliacrilammide al 10% ed elettroforesati in condizioni denaturanti. Al termine della corsa elettroforetica, il gel è stato colorato con Coomassie Brilliant Blue per 3 ore e successivamente decolorato overnight a temperatura ambiente. I profili delle bande proteiche sono stati analizzati mediante il software Gel Analyzer (versione 23.1.1; sviluppato da Istvan Lazar Jr., PhD, e Istvan Lazar Sr., PhD, CSc).

Figura 1. (A) Analisi SDS-PAGE con colorazione Coomassie Blue (kDa). Ladder: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder; BSA: albumina sierica bovina; L2: BEVs isolate da *L. fermentum* DSM 34871; L3: BEVs isolate da *L. fermentum* DSM 34872; L4: BEVs isolate da *L. fermentum* DSM 34873; C-: mezzo di crescita in assenza di crescita batterica; PBS: tampone fosfato. (B) Profili densitometrici delle bande proteiche corrispondenti alle corsie L2, L3 e L4. I grafici riportano l'intensità delle bande (asse y) in funzione della posizione in pixel (asse x), con le bande identificate evidenziate in rosso. (C) Curve di calibrazione ottenute utilizzando il marcatore PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, con i relativi coefficienti di correlazione (R^2).



Identificazione proteica mediante LC-MS/MS

Per l'identificazione delle proteine presenti nelle BEVs è stata eseguita la preparazione del campione mediante Filter-Aided Sample Preparation (FASP), utilizzando un protocollo modificato basato su Sielaff et al. (Sielaff et al., 2017)(2017). In breve, 50 µg di proteine sono stati caricati su filtri Nanosep con cutoff molecolare di 10 kDa (Pall Corporation, Portage, MI, USA), precedentemente risciacquati con 100 µL di acido formico (FA) all'1% (v/v). I filtri sono stati quindi lavati due volte con 200 µL di urea buffer (8 M urea e 100 mM Tris, pH 8.5 in acqua Milli-Q) per rimuovere i detergenti presenti nel tampone di estrazione. Successivamente, alla unità filtrante sono stati aggiunti 100 µL di soluzione di ditiotreitolo (DTT) (8 mM in urea buffer) e il campione è stato incubato per 15 minuti a 56 °C in blocco riscaldato, al buio, per consentire la riduzione delle proteine. Dopo due lavaggi con 100 µL di urea buffer, le proteine sono state alchilate mediante aggiunta di 100 µL di soluzione di 2-iodoacetamide (IAA) (50 mM in urea buffer), con incubazione al buio per 20 minuti a temperatura ambiente. Per lo scambio di buffer, sono stati aggiunti 100 µL di tampone bicarbonato di ammonio (AB) (50 mM in acqua Milli-Q). La digestione proteolitica è stata eseguita utilizzando tripsina: una

soluzione stock di tripsina (1 µg/µL) è stata preparata sciogliendo l'enzima in acido acetico 50 mM; successivamente 50 µL di soluzione di lavoro (0.01 µg/µL in tampone AB) sono stati aggiunti al filtro e il campione è stato incubato overnight a 37 °C in camera umida. La miscela peptidica ottenuta è stata raccolta mediante centrifugazione e acidificata con acido trifluoroacetico (TFA) al 10% (v/v) fino a una concentrazione finale di TFA pari allo 0.2% (v/v). I peptidi ottenuti mediante digestione FASP sono stati analizzati mediante cromatografia liquida nano-flow (nLC) accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (Orbitrap Fusion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), operante in modalità di ionizzazione positiva, con voltaggio di spray impostato a 1.7 kV e temperatura della sorgente a 275 °C, equipaggiata con sorgente nanoEASY-Spray. Per il sistema nLC (Ultimate 3000 UHPLC), il solvente A era costituito da acqua al 100% con 0.1% di acido formico, mentre il solvente B era composto da 80% acetonitrile e 0.1% di acido formico. I campioni sono stati caricati su una pre-colonna PepMap100 C18 (5 µm, 100 Å, 300 µm i.d. × 5 mm; Thermo Fisher Scientific) e separati su una colonna analitica EASY-Spray PepMap RSLC C18 (75 µm i.d., 3 µm, 100 Å; Thermo Fisher Scientific) a un flusso di 300 nL/min e temperatura di 40 °C. Il gradiente cromatografico è stato impostato come segue:

- da 2% a 10% di solvente B in 20 min,
- da 10% a 25% in 20 min,
- da 25% a 40% in 5 min,
- da 40% a 90% in 1 min, per un tempo totale di corsa di 60 minuti.

Le scansioni di massa completa (MS1) sono state acquisite in Orbitrap nell'intervallo m/z 350-1500, con automatic gain control (AGC) pari a 4.0×10^5 e tempo massimo di iniezione di 50 ms, con una risoluzione di 120.000 a m/z 200. Le analisi MS/MS (MS2) sono state eseguite in modalità *data-dependent acquisition* (top speed mode, ciclo di 3 s), selezionando gli ioni precursori più abbondanti con stato di carica compreso tra 2+ e 5+. L'isolamento è stato effettuato mediante quadrupolo con finestra di 1.6 m/z, con esclusione dinamica attiva per 30 s dopo una singola scansione. Per MS2, l'AGC era impostato a 1.0×10^3 e il tempo massimo di iniezione a 35 ms. La frammentazione è stata eseguita mediante Higher-energy Collisional Dissociation (HCD) con energia normalizzata pari al 30%. I dati sono stati acquisiti mediante software Xcalibur v4.4 (Thermo Fisher Scientific) ed elaborati con il software PEAKS Studio Xpro21 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada), utilizzando l'opzione *correct precursor only*. Gli spettri sono stati confrontati con i proteomi non revisionati

(UniProtKB/TrEMBL) di *Limosilactobacillus fermentum* (1.592 voci). Il false discovery rate (FDR) è stato fissato all'1% a livello proteico.

Le modificazioni post-traduzionali (PTMs) sono state impostate come segue:

- carbamidometilazione della cisteina (fissa; $\Delta\text{Mass} = +57.02$ Da),
- ossidazione della metionina (variabile; $\Delta\text{Mass} = +15.99$ Da),
- fosforilazione della tirosina ($\Delta\text{Mass} = +79.97$ Da),
- acetilazione N-terminale ($\Delta\text{Mass} = +42.01$ Da),
- perdita della metionina N-terminale ($\Delta\text{Mass} = -131.04$ Da).

È stata consentita la scissione non specifica a un'estremità del peptide, con un massimo di due siti di mancata clivazione ed enzima tripsina come specificità primaria. Le tolleranze massime sull'errore di massa per precursori e frammenti sono state impostate a 10 ppm.

Risultati

Caratterizzazione delle BEVs mediante NTA e potenziale ζ

Le BEVs sono state isolate da colture di diversi ceppi di *L. fermentum* cresciuti in terreno MRS e raccolti durante la fase esponenziale di crescita. La concentrazione e la distribuzione dimensionale delle vescicole isolate sono state analizzate mediante NTA. Come controllo, il PBS è stato analizzato nelle medesime condizioni di misura. I dati relativi alla distribuzione delle dimensioni delle particelle e alla loro concentrazione sono riportati nella Tabella 1. Come riportato in tabella, i ceppi L2 e L3 hanno mostrato concentrazioni particellari dell'ordine di 10^{12} particelle/mL, con dimensioni medie rispettivamente pari a 133 nm e 135.1 nm. Le distribuzioni dimensionali (X10-X90) variavano da 65.6 a 178.7 nm per L2 e da 64.7 a 182.0 nm per L3, indicando popolazioni di vescicole con caratteristiche dimensionali sovrapponibili tra i due ceppi. Il ceppo L4 ha invece mostrato una concentrazione particellare dell'ordine di 10^{11} particelle/mL, con una dimensione media di 134.5 nm e una distribuzione compresa tra 78.9 e 199.3 nm, evidenziando una variabilità leggermente superiore rispetto agli altri due ceppi. Il campione di PBS ha presentato una concentrazione particellare dell'ordine di 10^5 particelle/mL, una dimensione media di 159.4 nm e una distribuzione compresa tra 76.5 e 458.5 nm. Tale marcata riduzione del numero di particelle rispetto ai campioni batterici è risultata coerente con l'assenza di particelle biologiche nel controllo. Come riportato in Tabella 2, i tre ceppi di *L. fermentum* analizzati (L2, L3 e L4) hanno mostrato valori di potenziale ζ negativi, con variazioni moderate tra i ceppi. In particolare, L2 e L4 hanno evidenziato i valori più negativi (-27.98 ± 4.57 mV e -27.23 ± 1.30 mV, rispettivamente), mentre L3 ha mostrato un potenziale ζ leggermente meno negativo (-24.43 ± 1.81 mV). Il controllo PBS ha presentato un valore meno negativo (-17.50 ± 7.14 mV), in accordo con l'assenza di cariche superficiali di origine cellulare.

Tabella 1. Caratterizzazione fisica delle EVs derivate dai ceppi di LAB e dal controllo negativo (PBS). Tutti i ceppi batterici sono stati analizzati dopo una diluizione 1:10.000 in acqua ultrapura di grado HPLC, mentre il PBS è stato misurato non diluito come controllo. I valori sono espressi come media $\pm$ deviazione standard (n = 2).

Campione	Concentrazione (particles/mL)	Dimensioni (nm)	Distribuzione (X10-X90)
(L2)	$2.0 \pm 1.1 \times 10^{12}$	133.0 ± 49.3	65.6 - 178.7 nm
(L3)	$2.5 \pm 1.1 \times 10^{12}$	135.1 ± 54.4	64.7 - 182.0 nm
(L4)	$4.25 \pm 0.21 \times 10^{11}$	134.5 ± 60.1	78.9 - 199.3 nm
PBS	$9.25 \pm 3.89 \times 10^5$	159.4 ± 126.1	76.5 - 458.5 nm

Tabella 2. Valori di potenziale ζ (mV) dei ceppi di *L. fermentum* (L2, L3, L4) e del controllo PBS. I valori sono espressi come media $\pm$ deviazione standard.

Campione	Potenziale-Z (mV)
(L2)	-27.98 ± 4.57
(L3)	-24.43 ± 1.81
(L4)	-27.23 ± 1.30
PBS	-17.50 ± 7.14

Contenuto in DNA e RNA delle BEVs

I valori di DNA e RNA ottenuti mediante misurazioni al NanoDrop sono stati normalizzati su 10^9 particelle, in accordo con le raccomandazioni MISEV per la standardizzazione dei dati sulle BEVs (Théry et al., 2018; Welsh et al., 2024). A seguito della normalizzazione, sono state osservate evidenti differenze quantitative tra i campioni analizzati. In particolare, il campione L4 ha mostrato il contenuto più elevato sia di DNA ($0.55 \mu\text{g}/10^9 \text{ EV}$) sia di RNA ($1.20 \mu\text{g}/10^9 \text{ EV}$). I campioni L2 e L3 hanno invece presentato valori inferiori e tra loro comparabili, con un contenuto di DNA compreso tra 0.25 e $0.36 \mu\text{g}/10^9 \text{ EV}$ e un contenuto di RNA compreso tra 0.04 e $0.05 \mu\text{g}/10^9 \text{ EV}$. I valori normalizzati di DNA e RNA sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3. Caratterizzazione chimica delle BEVs isolate dai ceppi L2, L3 e L4. I dati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard.

<i>Ceppo di L. fermentum</i>	Contenuto in DNA ($\mu\text{g}/10^9$ particles)	Contenuto in RNA ($\mu\text{g}/10^9$ particles)
(L2)	0.25 ± 0.001	0.05 ± 0.01
(L3)	0.36 ± 0.005	0.04 ± 0.01
(L4)	0.55 ± 0.05	1.20 ± 0.10

Analisi proteica mediante SDS-PAGE

Il contenuto proteico totale delle EVs isolate dai ceppi L2, L3 e L4 è stato quantificato mediante saggio di Bradford. Le concentrazioni proteiche risultanti sono state pari a $1.30 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ per L2, $2.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ per L3 e $1.03 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ per L4. Il contenuto proteico delle BEVs di L2, L3 e L4 è stato ulteriormente valutato mediante SDS-PAGE (Fig. 1). Il marcatore di peso molecolare PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) è stato utilizzato come standard. Come controllo positivo sono stati caricati $4 \mu\text{g}$ di albumina sierica bovina (BSA), mentre $5 \mu\text{g}$ di BEVs di L2, L3 e L4 sono stati caricati per la valutazione della loro composizione proteica. Il mezzo di coltura in assenza di crescita batterica (C $^-$) e il PBS sono stati inclusi come controlli negativi. I profili proteici hanno evidenziato chiare differenze tra i ceppi analizzati. In particolare, L2 e L3 hanno mostrato un numero maggiore di bande distribuite lungo l'intera corsia, con una banda principale localizzata intorno a ~ 38 kDa. Il ceppo L4 ha invece mostrato un profilo più definito, caratterizzato da una banda predominante intorno a ~ 39 kDa. Nessuna banda è stata rilevata nel controllo PBS, confermando l'assenza di contaminazioni proteiche. Il controllo BSA ha mostrato la caratteristica banda a ~ 66 kDa, confermando la corretta risoluzione del gel e la sensibilità dell'analisi. Il campione C $^-$ non ha mostrato bande rilevabili, a conferma dell'assenza di contaminanti proteici derivanti dal mezzo di coltura. L'analisi densitometrica ha supportato tali osservazioni, evidenziando differenze nell'intensità dei picchi e nel peso molecolare stimato tra i diversi campioni (Fig. 1 B). Per ciascun ceppo è stata generata una curva di calibrazione per la determinazione del peso molecolare delle bande rilevate, con i valori corrispondenti riportati nella tabella associata (Fig. 1 C).

Identificazione proteica mediante LC-MS/MS

Le analisi di identificazione proteica mediante spettrometria di massa accoppiata a cromatografia liquida (LC-MS/MS) sulle BEVs sono attualmente in corso. Pertanto, i dati relativi a questa fase sperimentale non sono inclusi nella presente tesi. I risultati ottenuti da tali analisi saranno oggetto di successive elaborazioni e pubblicazioni scientifiche.

Discussione

Nel presente studio sono state isolate e caratterizzate le BEVs prodotte da tre ceppi di *Limosilactobacillus fermentum* (DSM 34871, DSM 34872 e DSM 34873), con l'obiettivo di fornire una prima descrizione delle loro proprietà fisico-chimiche e del loro contenuto molecolare. I risultati ottenuti confermano che anche questa specie appartenente ai LAB è in grado di produrre BEVs in quantità rilevanti, in linea con quanto riportato negli ultimi anni per altri lattobacilli e batteri Gram-positivi (Kurata et al., 2022; Li et al., 2024). L'analisi mediante Nanoparticle Tracking Analysis ha evidenziato che le BEVs presentano dimensioni medie comprese tra 133 e 135 nm, con distribuzioni dimensionali (X10-X90) compatibili con quelle descritte in letteratura per le BEVs di *Lactobacillus plantarum*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* e *Limosilactobacillus reuteri*, che generalmente rientrano nell'intervallo 80-200 nm (Kurata et al., 2022; Di Naro et al., 2025). I ceppi L2 e L3 hanno mostrato una produzione di particelle dell'ordine di 10^{12} particelle/mL, mentre L4 ha presentato valori inferiori (10^{11} particelle/mL), suggerendo una marcata variabilità ceppo-specificità funzionale nella capacità di produzione delle BEVs. Tale eterogeneità è ampiamente documentata in letteratura ed è attribuibile sia a fattori genetici intrinseci sia alle condizioni di crescita (Lee et al., 2023; Li et al., 2024). Il potenziale ζ negativo osservato per tutti e tre i ceppi (valori compresi tra -24 e -28 mV) è coerente con quanto riportato per le BEVs di LAB e di altri batteri Gram-positivi. La carica superficiale negativa è un parametro rilevante poiché contribuisce alla stabilità colloidale delle sospensioni vescicolari e può influenzare le interazioni elettrostatiche con superfici biologiche, cellule e biofilm (Kurata et al., 2022). Il valore meno negativo osservato nel controllo PBS conferma che la carica è effettivamente attribuibile alla composizione di membrana delle vescicole. Per quanto riguarda il contenuto in acidi nucleici, la normalizzazione su 10^9 particelle, secondo le raccomandazioni MISEV, ha permesso di confrontare in modo attendibile i diversi ceppi. Il ceppo L4 ha mostrato un contenuto significativamente più elevato sia di DNA sia di RNA rispetto a L2 e L3. Questo dato suggerisce che le BEVs di L4 possano essere particolarmente attive nel trasferimento di materiale genetico e molecole regolatorie, aspetto che in letteratura è stato associato alla capacità delle vescicole di modulare l'espressione genica delle cellule bersaglio e di partecipare a meccanismi di comunicazione intercellulare e adattamento ambientale (Chen et al., 2024; Li et al., 2024). La quantificazione del contenuto proteico mediante saggio di Bradford ha mostrato differenze tra i ceppi, con una maggiore concentrazione proteica nelle BEVs di L3 rispetto a L2 e L4. Questo risultato è coerente con quanto riportato in altri studi, nei quali il carico proteico delle vescicole risulta fortemente

dipendente dal ceppo produttore e dalle condizioni di crescita. L'analisi SDS-PAGE ha ulteriormente confermato la complessità del contenuto proteico delle BEVs (Lee et al., 2023). In particolare, L2 e L3 hanno mostrato un numero maggiore di bande distribuite lungo l'intero intervallo di peso molecolare, mentre L4 ha evidenziato un profilo più definito, dominato da una banda principale intorno a ~39 kDa. L'assenza di bande nel PBS e nel controllo negativo (C-) conferma la buona purezza delle preparazioni e l'assenza di contaminazioni proteiche provenienti dal mezzo di coltura. Questi risultati sono in accordo con studi precedenti su BEVs di LAB (Kurata et al., 2022). Sebbene nel presente lavoro non sia stata completata l'identificazione proteica mediante LC-MS/MS, i dati ottenuti mediante SDS-PAGE indicano chiaramente che le BEVs di *L. fermentum* possiedono un contenuto proteico strutturalmente complesso e potenzialmente funzionale. Nel loro insieme, questi dati sperimentali supportano l'ipotesi che le BEVs rappresentino veri e propri effettori molecolari dell'attività biologica dei LAB. La letteratura recente attribuisce alle BEVs dei lattobacilli un ruolo nella modulazione dell'immunità innata, nella protezione della barriera epiteliale e, soprattutto, nell'interferenza con la formazione del biofilm patogeno (Chen et al., 2024; Li et al., 2024). In questo contesto, la caratterizzazione fisico-chimica condotta nel presente studio costituisce un presupposto indispensabile per futuri studi funzionali volti a valutare in modo diretto l'attività immunomodulatoria, antimicrobica e antibiofilm delle BEVs di *L. fermentum*, anche in modelli *in vivo* alternativi come *G. mellonella*. Nel complesso, i risultati ottenuti rafforzano il concetto delle BEVs come potenziali effettori postbiotici "cell-free" dei LAB, aprendo prospettive applicative in ambito biomedico e biotecnologico (Lee et al., 2023; Li et al., 2024).

CONSIDERAZIONI FINALI

Nel presente lavoro sono stati analizzati tre modelli sperimentali distinti in *G. mellonella*: immunomodulazione in assenza di challenge patogeno, infezione da ustione con *P. aeruginosa* e profilassi orale contro *S. Typhimurium* ed *E. faecalis*, con l'obiettivo di valutare in modo comparativo il potenziale dei LAB come modulatori dell'immunità innata e agenti protettivi *in vivo*. Nonostante le profonde differenze tra i modelli, emerge un denominatore comune: l'efficacia dei LAB non dipende solamente dalla loro attività antimicrobica diretta, ma dalla capacità di rimodulare in modo ceppo e contesto-specifico l'assetto funzionale del sistema immunitario dell'ospite. Nel modello privo di infezione, *L. plantarum* e *L. kefir* hanno indotto profili trascrizionali profondamente differenti, evidenziando che l'interazione LAB-ospite non si limita a una generica attivazione dell'immunità innata. LP ha determinato una marcata attivazione coordinata delle vie Toll e IMD, con una forte componente redox-dipendente e una centralità del fattore *relish*, mentre LK ha indotto una risposta più distribuita e sincrona tra moduli epiteliali, umorali e cellulari. Questa divergenza, che emerge solo dall'analisi di rete, anticipa quanto osservato nei modelli infettivi, suggerendo che ogni ceppo impronta una firma immunitaria specifica già in condizioni basali. Nel modello di ustione infettata da *P. aeruginosa*, tali differenze funzionali si traducono in esiti biologicamente rilevanti. I LAB, in particolare i ceppi isolati da latte materno umano, hanno mostrato un'efficacia protettiva *in vivo* paragonabile a quella della gentamicina, nonostante un'attività inibitoria *in vitro* variabile e talvolta modesta. Il caso del ceppo L2, scarsamente attivo in overlay assay ma altamente protettivo *in vivo*, evidenzia il fallimento predittivo degli screening basati esclusivamente su saggi *in vitro* e suggerisce che la protezione osservata derivi prevalentemente da meccanismi mediati dall'ospite, piuttosto che da una semplice inibizione diretta della crescita patogena. Coerentemente, l'attenuazione dell'iper-espressione di *gallerimycin* e la modulazione di *relish* indicano che i LAB non si limitano a potenziare la risposta immunitaria, ma ne limitano la deriva iperinflammatoria durante l'infezione. Questa interpretazione è ulteriormente rafforzata dallo studio profilattico orale con *L. fermentum* DSM 34872. In questo modello, la protezione non è associata a un incremento massivo dell'espressione di peptidi antimicrobici, bensì a una loro attenuazione controllata, accompagnata da un miglioramento del punteggio di melanizzazione e della sopravvivenza. In particolare, il pretrattamento profilattico con L3 riduce l'induzione sistemica di *dorsal*, *relish*, *gallerimycin* e *gloverin*, ma ne mantiene o aumenta l'espressione a livello intestinale, suggerendo uno spostamento funzionale da una

risposta infiammatoria sistemica a una risposta locale più efficiente. Tale fenomeno indica che una produzione eccessiva e prolungata di AMP può essere deleteria per l'ospite, probabilmente a causa di costi metabolici e danni tissutali, e che i LAB agiscono favorendo un equilibrio tra attivazione e tolleranza immunitaria. Il confronto tra i tre modelli evidenzia dunque un principio trasversale: i LAB esercitano il loro effetto protettivo modulando la topologia delle reti immunitarie dell'ospite. In assenza di infezione, tale modulazione si manifesta come riorganizzazione dei nodi centrali delle vie Toll e IMD; nel contesto dell'ustione infettata, come contenimento della risposta iperinflammatoria; nel modello profilattico intestinale, come riallocazione compartimentale della risposta immune. In tutti i casi, la protezione è associata non a una massimizzazione dell'attivazione, ma a una sua regolazione fine. Un ulteriore elemento di convergenza tra i tre studi è rappresentato dalla caratterizzazione preliminare delle BEVs prodotte da *L. fermentum*, che costituisce il quarto asse tematico del lavoro di tesi. L'isolamento e l'analisi fisico-chimica delle BEVs dei ceppi L2, L3 e L4 ha dimostrato che anche questa specie di LAB è in grado di rilasciare in modo efficiente vescicole nanoscalari con caratteristiche dimensionali di circa 130-135 nm, carica superficiale negativa e contenuto significativo di DNA, RNA e proteine, in linea con quanto riportato per altri lattobacilli. La marcata ceppo-specificità funzionale osservata in termini di concentrazione particellare, contenuto in acidi nucleici e profilo proteico suggerisce che la biogenesi delle BEVs rappresenti una proprietà intrinseca del ceppo e non un semplice sottoprodotto del metabolismo batterico. Questi dati forniscono una chiave interpretativa unificante per i risultati ottenuti nei modelli *in vivo*: la protezione osservata nei diversi contesti sperimentali potrebbe essere mediata, almeno in parte, dal rilascio di effettori molecolari veicolati in forma vescicolare, piuttosto che esclusivamente dalla presenza di cellule batteriche vive. In questo senso, le BEVs si configurano come probabili veri e propri mediatori della comunicazione microbo-ospite, capaci di modulare le vie immunitarie Toll e IMD attraverso il trasporto selettivo di ligandi immunoattivi, come già suggerito per altri LAB. In conclusione, l'integrazione dei tre studi, e il preliminare sulle BEVs, dimostra che la selezione razionale dei LAB deve basarsi su parametri funzionali *in vivo* e su analisi di rete dell'immunità dell'ospite. *G. mellonella* si configura pertanto come uno strumento preclinico strategico per identificare ceppi candidati con reale potenziale traslazionale, riducendo l'impiego di vertebrati e orientando in modo informato le successive fasi di validazione.

LIMITI DELLO STUDIO

Sebbene i risultati ottenuti supportino in modo consistente l'impiego di *G. mellonella* come modello preclinico alternativo per lo studio delle interazioni ospite-LAB, il presente lavoro presenta una serie di limiti intrinseci che devono essere considerati nell'interpretazione dei dati e nella loro traslazione verso modelli vertebrati e applicazioni cliniche. Un primo limite fondamentale è rappresentato dall'assenza di immunità adattativa in *G. mellonella*. Il modello consente di studiare esclusivamente meccanismi di immunità innata, impedendo qualsiasi valutazione di memoria immunologica, risposte antigene-specifiche ed espansione clonale linfocitaria, che nei vertebrati costituiscono componenti centrali della protezione a lungo termine. Di conseguenza, non è possibile determinare se i LAB inducano fenomeni di “trained immunity” o modulazioni durature della risposta immunitaria. Un secondo limite riguarda la struttura e la stabilità del microbiota intestinale di questo insetto. A differenza dei mammiferi, l'insetto ospita comunità microbiche transitorie, fortemente dipendenti dall'ambiente e prive della complessità ecologica tipica dei modelli vertebrati. Questa caratteristica riduce significativamente la rilevanza traslazionale delle interazioni LAB-microbiota e ha impedito un'analisi approfondita delle modificazioni della comunità microbica intestinale dopo somministrazione probiotica. La finestra sperimentale ristretta rappresenta un ulteriore limite metodologico. Le larve entrano rapidamente fase di impupamento, restringendo il periodo utile di osservazione a pochi giorni. Questo aspetto ha reso impossibile valutare fenomeni di colonizzazione stabile, persistenza intestinale o effetti a lungo termine dei LAB, in particolare nel modello di somministrazione orale profilattica. Nel modello di ustione, sebbene *G. mellonella* riproduca numerosi aspetti chiave del trauma e dell'infezione, le larve non sono in grado di completare i processi di rigenerazione tissutale e tendono a impupare con la lesione, seppur melanizzata, ancora presente. Ciò limita la possibilità di studiare in modo esaustivo i meccanismi di guarigione e rimodellamento della ferita, aspetti centrali nella clinica delle ustioni umane. Dal punto di vista molecolare, l'analisi trascrizionale si è concentrata su pannelli genici selezionati. Sebbene tali geni rappresentino marcatori consolidati delle principali vie immunitarie, questo approccio non consente di cogliere l'intera complessità delle risposte dell'ospite. L'assenza di analisi omiche globali (trascrittomica, proteomica, metabolomica) limita la capacità di identificare pathway emergenti o meccanismi non canonici di immunomodulazione. Un ulteriore limite riguarda la parziale conservazione evolutiva tra proteine di *G. mellonella* e i loro omologhi umani. Sebbene per alcuni target (ad es. NOX4-

like, Hem/NCKAP1, fattori NF- κ B-like) sia stata osservata un'elevata omologia funzionale, per altri (come 18-wheeler e IMPI) la somiglianza è limitata a specifici domini. Questo implica che l'interpretazione traslazionale dei risultati deve essere condotta con cautela e supportata da ulteriori validazioni funzionali in modelli vertebrati. Infine, il modello non consente di valutare pienamente gli effetti sistemici complessi che coinvolgono organi distanti dall'intestino, come fegato, sistema nervoso o asse intestino-cervello, né di indagare interazioni immuno-endocrine e neuroimmunologiche tipiche dei mammiferi.

PROSPETTIVE FUTURE

I risultati ottenuti nel corso di questa tesi aprono diverse prospettive di sviluppo sia sul piano metodologico sia su quello applicativo, rafforzando il ruolo di *G. mellonella* come un efficace modello preclinico. In prospettiva, lo sviluppo più rilevante consiste nel consolidare questo modello come nodo intermedio della pipeline sperimentale, capace di integrare readout fenotipici (sopravvivenza, melanizzazione), cellulari e molecolari (espressione genica di regolatori ed effettori dell'immunità innata), indirizzando in modo razionale la selezione dei candidati da validare successivamente in modelli vertebrati. Un primo asse di sviluppo riguarda l'ampliamento dello screening funzionale. L'estensione del numero di ceppi testati, includendo isolati provenienti da differenti matrici biologiche e con caratteristiche metaboliche/eco-fisiologiche diverse, consentirebbe di rafforzare le conclusioni sulla ceppo-specificità funzionale e di identificare profili di risposta ricorrenti. In questa direzione, risulta particolarmente utile standardizzare ulteriormente le condizioni sperimentali (stadio larvale, carica inoculata, via di somministrazione, tempi di campionamento) e implementare un set minimo di readout condivisi tra modelli, in modo da rendere confrontabili i risultati ottenuti in differenti scenari (ad esempio infezione sistemica vs intestinale vs ferita). Un secondo asse riguarda il potenziamento dell'interpretazione meccanicistica dei dati. Nei modelli infettivi, un limite intrinseco è la difficoltà di distinguere in modo univoco tra un effetto diretto sul patogeno e una modulazione indiretta mediata dall'ospite. Studi futuri dovranno quindi integrare disegni sperimentali che consentano di separare queste componenti, ad esempio confrontando LAB vivi con preparazioni inattivate, frazioni cell-free o prodotti secreti, e associando agli end-point di sopravvivenza misure più dirette di carica microbica e di dinamica dell'infezione. In parallelo, l'integrazione di analisi più ampie come, ad esempio, trascrittomica mirata/estesa, proteomica o metabolomica delle condizioni selezionate, permetterebbe di superare la lettura basata su un numero limitato di marcatori, identificando pathway non canonici e modulazioni di rete non immediatamente deducibili dai soli geni più comuni delle vie Toll e IMD. Un ulteriore sviluppo metodologico, particolarmente rilevante per i modelli intestinali, riguarda l'ottimizzazione della somministrazione orale e la quantificazione della persistenza/transito dei ceppi nel tratto intestinale larvale. Sebbene la finestra sperimentale dell'ultimo instar imponga vincoli temporali, l'impiego di ceppi marcati, approcci di imaging o quantificazioni molecolari (qPCR) potrebbe fornire informazioni aggiuntive sulla distribuzione intestinale e sulla relazione tra dose effettiva e risposta dell'ospite. Analogamente, nel modello di ustione, l'introduzione di readout

dedicati a infiammazione e riparazione (marcatori di danno tissutale, analisi istologiche o scoring morfologico standardizzato della lesione) consentirebbe di trasformare il modello da principalmente funzionale a più marcatamente meccanicistico, distinguendo meglio attività antibatterica, immunomodulazione e supporto ai processi di contenimento del danno. All'interno di queste prospettive, un'evoluzione naturale e strategica del progetto riguarda lo studio delle BEVs prodotte dai LAB. Sebbene nella presente tesi lo studio delle BEVs risulti meno sviluppato rispetto ai modelli basati sui batteri vivi, esso rappresenta un'estensione coerente del razionale complessivo: se l'effetto dei LAB osservato nei tre studi è in larga misura mediato da segnali molecolari capaci di rimodulare in modo fine l'immunità innata (evitando sia l'inerzia difensiva sia l'iperattivazione dannosa), allora le BEVs costituiscono un candidato privilegiato come veicolo di tali segnali. Le prospettive future includono pertanto una valutazione sistematica delle BEVs lungo tre direttrici principali:

1. Attività immunomodulante

Sarà prioritario stabilire se le BEVs siano in grado di riprodurre, in tutto o in parte, le firme immunitarie osservate con i LAB vivi nei diversi modelli. In *G. mellonella* ciò potrà essere indagato misurando:

- readout fenotipici (sopravvivenza, melanizzazione, indici di salute);
- modulazione di regolatori a monte ed effettori a valle in compartimenti distinti (emolinfa e intestino);
- eventuali differenze cinetiche e compartimentali rispetto ai batteri vivi, per verificare se le BEVs promuovano una risposta più localizzata o, al contrario, un'attivazione più ampia.

In termini sperimentali, sarà cruciale includere confronti diretti BEVs vs cellule vive vs frazioni inattivate, così da chiarire il contributo relativo delle vescicole rispetto ad altri determinanti batterici.

2. Attività antimicrobica

Un secondo obiettivo è definire se e in che misura le BEVs esercitino un effetto diretto sui patogeni testati in tesi (*P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *E. faecalis*), distinguendo tra:

- inibizione della crescita planktonica;
- interferenza con virulenza e fitness del patogeno;
- possibile sinergia con antibiotici (ad es. aminoglicosidi nel contesto ustioni), tema di particolare interesse traslazionale in ottica di contenimento dell'antibiotico-resistenza.

L'obiettivo non è solo verificarne la funzionalità, ma comprendere se l'eventuale protezione *in vivo* sia spiegata da un'azione antimicrobica diretta, da immunomodulazione o da entrambe.

3. Attività antibiofilm

Considerata la rilevanza clinica dei biofilm, soprattutto nelle ferite e nelle infezioni persistenti, una priorità sarà valutare l'effetto delle BEVs su:

- formazione e maturazione del biofilm (inibizione precoce);
- stabilità della matrice e integrità strutturale (disgregazione);
- recupero di sensibilità agli antibiotici e riduzione della tolleranza tipica del biofilm.

In particolare, nel contesto del modello di ustione da *P. aeruginosa*, la componente antibiofilm può rappresentare un punto di raccordo forte tra la parte “antimicrobica” e quella “immunomodulante”, perché un biofilm più fragile o meno aderente può ridurre carica patogena e stimolo infiammatorio, facilitando l'azione dell'immunità innata. Lo sviluppo del filone BEVs beneficerà inoltre di una caratterizzazione standardizzata delle preparazioni (quantificazione, purezza, dimensioni e contenuto), indispensabile per rendere i risultati riproducibili e confrontabili tra ceppi e condizioni. In prospettiva, la combinazione tra *G. mellonella* e BEVs potrebbe consentire di identificare preparazioni postbiotiche con profilo funzionale definito, da testare successivamente in modelli vertebrati, con potenziali vantaggi in termini di sicurezza, controllabilità e applicabilità. In conclusione, le prospettive future delineate in questa tesi puntano a trasformare *G. mellonella* in una modello integrato per la selezione razionale di LAB e dei loro metaboliti bioattivi. L'inserimento strutturato delle BEVs in questa pipeline rappresenta un passaggio logico e promettente per connettere l'osservazione funzionale *in vivo* con l'identificazione dei determinanti molecolari responsabili degli effetti

probiotici, aprendo la strada a strategie innovative immunomodulanti, antimicrobiche e antibiofilm.

BIBLIOGRAFIA

- Abedi, E., and Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon* 6, e04974. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04974
- Adejumo, S. A., Oli, A. N., Rowaiye, A. B., Igbokwe, N. H., Ezejiegu, C. K., and Yahaya, Z. S. (2023). Immunomodulatory Benefits of Probiotic Bacteria: A Review of Evidence. *OBM Genetics* 7, 1–73. doi: 10.21926/obm.genet.2304206
- Admella, J., and Torrents, E. (2023). Investigating bacterial infections in *Galleria mellonella* larvae: Insights into pathogen dissemination and behavior. *J Invertebr Pathol* 200, 107975. doi: 10.1016/j.jip.2023.107975
- Agarwal, R. G., Sharma, P., and Nyati, K. K. (2019). microRNAs in Mycobacterial Infection: Modulation of Host Immune Response and Apoptotic Pathways. *Immune Netw* 19, e30. doi: 10.4110/in.2019.19.e30
- Aggarwal, P., Saxena, S., and Nagi, N. (2024). Possible impact of revisions in disc diffusion breakpoints for aminoglycosides and piperacillin/tazobactam in the 33rd edition of CLSI M100 document on clinical reporting and use in Indian settings with low susceptibility. *Indian Journal of Medical Microbiology* 49, 100602. doi: 10.1016/j.ijmmb.2024.100602
- Alagiakrishnan, K., Morgadinho, J., and Halverson, T. (2024). Approach to the diagnosis and management of dysbiosis. *Front. Nutr.* 11. doi: 10.3389/fnut.2024.1330903
- Aleksandrowicz, A., Carolak, E., Dutkiewicz, A., Błachut, A., Waszczuk, W., and Grzymajlo, K. (2023). Better together-Salmonella biofilm-associated antibiotic resistance. *Gut Microbes* 15, 2229937. doi: 10.1080/19490976.2023.2229937
- Allonsius, C. N., Van Beeck, W., De Boeck, I., Wittouck, S., and Lebeer, S. (2019). The microbiome of the invertebrate model host *Galleria mellonella* is dominated by *Enterococcus*. *Animal Microbiome* 1, 7. doi: 10.1186/s42523-019-0010-6
- Altincicek, B., Knorr, E., and Vilcinskas, A. (2008). Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Developmental & Comparative Immunology* 32, 585–595. doi: 10.1016/j.dci.2007.09.005
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Andrejko, M., Mak, P., Siemińska-Kuczer, A., Iwański, B., Wojda, I., Suder, P., et al. (2021). A comparison of the production of antimicrobial peptides and proteins by *Galleria mellonella* larvae in response to infection with two *Pseudomonas aeruginosa* strains differing in the profile of secreted proteases. *Journal of Insect Physiology* 131, 104239. doi: 10.1016/j.jinsphys.2021.104239
- Anjum, M., Laitila, A., Ouwehand, A. C., and Forssten, S. D. (2022). Current Perspectives on Gastrointestinal Models to Assess Probiotic-Pathogen Interactions. *Front Microbiol* 13, 831455. doi: 10.3389/fmicb.2022.831455

- Anumudu, C. K., Miri, T., and Onyeaka, H. (2024). Multifunctional Applications of Lactic Acid Bacteria: Enhancing Safety, Quality, and Nutritional Value in Foods and Fermented Beverages. *Foods* 13, 3714. doi: 10.3390/foods13233714
- Argenta, A., Satish, L., Gallo, P., Liu, F., and Kathju, S. (2016). Local Application of Probiotic Bacteria Prophylaxes against Sepsis and Death Resulting from Burn Wound Infection. *PLoS One* 11, e0165294. doi: 10.1371/journal.pone.0165294
- Arias, L. S., Butcher, M. C., Short, B., McKlound, E., Delaney, C., Kean, R., et al. (2020). Chitosan Ameliorates *Candida auris* Virulence in a *Galleria mellonella* Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother* 64, e00476-20. doi: 10.1128/AAC.00476-20
- Asare, P. T., Zurfluh, K., Greppi, A., Lynch, D., Schwab, C., Stephan, R., et al. (2020). Reuterin Demonstrates Potent Antimicrobial Activity Against a Broad Panel of Human and Poultry Meat *Campylobacter* spp. Isolates. *Microorganisms* 8, 78. doi: 10.3390/microorganisms8010078
- Ashaolu, T. J., Greff, B., and Varga, L. (2025). Action and immunomodulatory mechanisms, formulations, and safety concerns of probiotics. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 44, 4–15. doi: 10.12938/bmfh.2024-006
- Azzopardi, E. A., Azzopardi, E., Camilleri, L., Villapalos, J., Boyce, D. E., Dziewulski, P., et al. (2014). Gram Negative Wound Infection in Hospitalised Adult Burn Patients-Systematic Review and Metanalysis-. *PLoS One* 9, e95042. doi: 10.1371/journal.pone.0095042
- Baeuerle, P. A. (1991). The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1072, 63–80. doi: 10.1016/0304-419x(91)90007-8
- Bergin, D., Reeves, E. P., Renwick, J., Wientjes, F. B., and Kavanagh, K. (2005). Superoxide Production in *Galleria mellonella* Hemocytes: Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils. *Infection and Immunity* 73, 4161–4170. doi: 10.1128/iai.73.7.4161-4170.2005
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., and Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 61, 160–174. doi: 10.1159/000342079
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., et al. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Front. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.01662
- Blandino, G., Fazio, D., Petronio, G. P., Inturri, R., Tempera, G., and Furneri, P. M. (2016). Labeling quality and molecular characterization studies of products containing *Lactobacillus* spp. strains. *Int J Immunopathol Pharmacol* 29, 121–128. doi: 10.1177/0394632015600534
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Briaud, P., and Carroll, R. K. (2020). Extracellular Vesicle Biogenesis and Functions in Gram-Positive Bacteria. *Infect Immun* 88, e00433-20. doi: 10.1128/IAI.00433-20

- Bron, P. A., Kleerebezem, M., Brummer, R.-J., Cani, P. D., Mercenier, A., MacDonald, T. T., et al. (2017). Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br J Nutr* 117, 93–107. doi: 10.1017/S0007114516004037
- Brown, J., Doloresco Iii, F., and Mylotte, J. M. (2009). “Never events”: not every hospital-acquired infection is preventable. *Clin Infect Dis* 49, 743–746. doi: 10.1086/604719
- Browne, N., Heelan, M., and Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 4, 597–603. doi: 10.4161/viru.25906
- Bugyna, L., Kendra, S., and Bujdáková, H. (2023). Galleria mellonella-A Model for the Study of aPDT-Prospects and Drawbacks. *Microorganisms* 11, 1455. doi: 10.3390/microorganisms11061455
- Bui, T. N. Y., Paul, A., Guleria, S., O’Sullivan, J. M., and Toldi, G. (2025). Short-chain fatty acids—a key link between the gut microbiome and T-lymphocytes in neonates? *Pediatr Res*, 1–9. doi: 10.1038/s41390-025-04075-0
- Burkhardt, A. M., Perez-Lopez, A., Ushach, I., Catalan-Dibene, J., Nuccio, S.-P., Chung, L. K., et al. (2019). CCL28 Is Involved in Mucosal IgA Responses, Olfaction, and Resistance to Enteric Infections. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 39, 214–223. doi: 10.1089/jir.2018.0099
- Calvillo, L. (2022). Editorial: 3Rs approach (replace, reduce and refine animal models) to improve preclinical research. *Front Physiol* 13, 1040575. doi: 10.3389/fphys.2022.1040575
- Cammarata-Mouchtouris, A., Acker, A., Goto, A., Chen, D., Matt, N., and Leclerc, V. (2022). Dynamic Regulation of NF- κ B Response in Innate Immunity: The Case of the IMD Pathway in Drosophila. *Biomedicines* 10, 2304. doi: 10.3390/biomedicines10092304
- Capra, J. A., and Singh, M. (2007). Predicting functionally important residues from sequence conservation. *Bioinformatics* 23, 1875–1882. doi: 10.1093/bioinformatics/btm270
- Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Romanin, D. E., Serradell, M. A., and Urdaci, M. C. (2015). Impact of Kefir Derived Lactobacillus kefir on the Mucosal Immune Response and Gut Microbiota. *Journal of Immunology Research* 2015, 361604. doi: 10.1155/2015/361604
- Carmo, P. H. F., de Lima, P. M. N., Silva, F. A., Ribeiro, J. L., Junqueira, J. C., and Garcia, M. T. (2025). Impact of egg incubation on hemocyte recruitment and susceptibility of Galleria mellonella larvae to pathogens. *Front. Microbiol.* 16. doi: 10.3389/fmicb.2025.1611104
- Castro, C. N., Rosenzweig, M., Carapito, R., Shahrooei, M., Konantz, M., Khan, A., et al. (2020). NCKAP1L defects lead to a novel syndrome combining immunodeficiency, lymphoproliferation, and hyperinflammation. *J Exp Med* 217, e20192275. doi: 10.1084/jem.20192275
- Cesare, G. B. D., Lorenz, M. C., Garsin, D. A., and Cristy, S. A. (2020). Antimicrobial Peptides: a New Frontier in Antifungal Therapy. *mBio* 11. doi: 10.1128/mbio.02123-20
- Champion, O. L., Wagley, S., and Titball, R. W. (2016). Galleria mellonella as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence* 7, 840–845. doi: 10.1080/21505594.2016.1203486

- Chandra, K., Chowdhury, A. R., Chatterjee, R., and Chakravorty, D. (2022). GH18 family glycoside hydrolase Chitinase A of *Salmonella* enhances virulence by facilitating invasion and modulating host immune responses. *PLOS Pathogens* 18, e1010407. doi: 10.1371/journal.ppat.1010407
- Charitos, I. A., Scacco, S., Cotoia, A., Castellaneta, F., Castellana, G., Pasqualotto, F., et al. (2025). Intestinal Microbiota Dysbiosis Role and Bacterial Translocation as a Factor for Septic Risk. *Int J Mol Sci* 26, 2028. doi: 10.3390/ijms26052028
- Chatsirisakul, O., Leenabanchong, N., Siripaopradit, Y., Chang, C.-W., Buhngamongkol, P., and Pongpirul, K. (2025). Strain-Specific Therapeutic Potential of *Lactiplantibacillus plantarum*: A Systematic Scoping Review. *Nutrients* 17, 1165. doi: 10.3390/nu17071165
- Chen, B., Brinkmann, K., Chen, Z., Pak, C. W., Liao, Y., Shi, S., et al. (2014). The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell* 156, 195–207. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.048
- Chen, C.-M., Lin, C.-T., Cheng, S.-H., Huang, C.-L., Tsai, Y.-C., Wu, C.-C., et al. (2021). *Lactobacillus plantarum* PS128 Promotes Intestinal Motility, Mucin Production, and Serotonin Signaling in Mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 14. doi: 10.1007/s12602-021-09814-3
- Chen, X., Bai, H., Mo, W., Zheng, X., Chen, H., Yin, Y., et al. (2025). Lactic Acid Bacteria Bacteriocins: Safe and Effective Antimicrobial Agents. *Int J Mol Sci* 26, 4124. doi: 10.3390/ijms26094124
- Chen, Y., Xiao, L., Zhou, M., and Zhang, H. (2024). The microbiota: a crucial mediator in gut homeostasis and colonization resistance. *Front Microbiol* 15, 1417864. doi: 10.3389/fmicb.2024.1417864
- Christodoulou, A., Tsai, J. Y., Suwankitwat, N., Anderson, A., and Iritani, B. M. (2024). Hem1 inborn errors of immunity: waving goodbye to coordinated immunity in mice and humans. *Front. Immunol.* 15. doi: 10.3389/fimmu.2024.1402139
- Corcione, S., De Nicolò, A., Lupia, T., Segala, F. V., Pensa, A., Corgiat Loia, R., et al. (2021). Observed concentrations of amikacin and gentamycin in the setting of burn patients with gram-negative bacterial infections: Preliminary data from a prospective study. *Therapies* 76, 409–414. doi: 10.1016/j.therap.2020.10.003
- Croatti, V., Parolin, C., Giordani, B., Foschi, C., Fedi, S., and Vitali, B. (2022). *Lactobacilli* extracellular vesicles: potential postbiotics to support the vaginal microbiota homeostasis. *Microb Cell Fact* 21, 237. doi: 10.1186/s12934-022-01963-6
- Curciarello, R., Yantorno, M., Docena, G. H., Salto, I., Sambuelli, A. M., Serradell, M. D. L. Á., et al. (2021). Probiotic *Lactobacilli* Isolated from Kefir Promote Down-Regulation of Inflammatory Lamina Propria T Cells from Patients with Active IBD. *Frontiers in Pharmacology* 12. doi: 10.3389/fphar.2021.658026
- Cutuli, M. A., Guarnieri, A., Pietrangelo, L., Magnifico, I., Venditti, N., Recchia, L., et al. (2021). Potential Mucosal Irritation Discrimination of Surface Disinfectants Employed against SARS-CoV-2 by *Limacus flavus* Slug Mucosal Irritation Assay. *Biomedicines* 9, 424. doi: 10.3390/biomedicines9040424

- Cutuli, M. A., Petronio Petronio, G., Vergalito, F., Magnifico, I., Pietrangelo, L., Venditti, N., et al. (2019). *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence* 10, 527–541. doi: 10.1080/21505594.2019.1621649
- De Gregorio, E., Spellman, P. T., Tzou, P., Rubin, G. M., and Lemaitre, B. (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J* 21, 2568–2579. doi: 10.1093/emboj/21.11.2568
- DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., and Mizoguchi, E. (2016). Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis* 22, 1137–1150. doi: 10.1097/MIB.0000000000000750
- Desbois, A. P., and Coote, P. J. (2011). Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother* 66, 1785–1790. doi: 10.1093/jac/dkr198
- Di Naro, M., Petronio Petronio, G., Mukhtar, F., Cutuli, M. A., Magnifico, I., Falcone, M., et al. (2025). Extracellular Vesicles in Bacteria, Archaea, and Eukaryotes: Mechanisms of Inter-Kingdom Communication and Clinical Implications. *Microorganisms* 13, 636. doi: 10.3390/microorganisms13030636
- Di Vincenzo, F., Del Gaudio, A., Petito, V., Lopetuso, L. R., and Scaldaferri, F. (2024). Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern Emerg Med* 19, 275–293. doi: 10.1007/s11739-023-03374-w
- Didriksen, B. J., Eshleman, E. M., and Alenghat, T. (2024). Epithelial regulation of microbiota-immune cell dynamics. *Mucosal Immunol* 17, 303–313. doi: 10.1016/j.mucimm.2024.02.008
- Ding, G., Yang, X., Li, Y., Wang, Y., Du, Y., Wang, M., et al. (2025). Gut microbiota regulates gut homeostasis, mucosal immunity and influences immune-related diseases. *Mol Cell Biochem* 480, 1969–1981. doi: 10.1007/s11010-024-05077-y
- Dinh, H., Semenec, L., Kumar, S. S., Short, F. L., and Cain, A. K. (2021). Microbiology's next top model: *Galleria* in the molecular age. *Pathog Dis* 79, ftab006. doi: 10.1093/femspd/ftab006
- Directive - 2010/63 - EN - EUR-Lex (n.d.). Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj> (Accessed July 10, 2025).
- Domínguez Rubio, A. P., D'Antoni, C. L., Piuri, M., and Pérez, O. E. (2022). Probiotics, Their Extracellular Vesicles and Infectious Diseases. *Front. Microbiol.* 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.864720
- Du, Y., He, C., An, Y., Huang, Y., Zhang, H., Fu, W., et al. (2024). The Role of Short Chain Fatty Acids in Inflammation and Body Health. *Int J Mol Sci* 25, 7379. doi: 10.3390/ijms25137379
- EFSA Panel on Dietetic Products, N. and A. (NDA) (2016). General scientific guidance for stakeholders on health claim applications. *EFSA Journal* 14, 4367. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4367

- EFSA Panel on Dietetic Products, N. and A. (NDA) (2021). Scientific and technical guidance for the preparation and presentation of a health claim application (Revision 3). *EFSA Journal* 19, e06554. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6554
- Ericsson, A. C. (2019). The use of non-rodent model species in microbiota studies. *Lab Anim* 53, 259–270. doi: 10.1177/0023677219834593
- Erkosar, B., Storelli, G., Defaye, A., and Leulier, F. (2013). Host-Intestinal Microbiota Mutualism: “Learning on the Fly.” *Cell Host & Microbe* 13, 8–14. doi: 10.1016/j.chom.2012.12.004
- Fakhry, A. K., and Aljanabi, A. O. (2024). The Effect of Pseudomonas Infection with Burns Patients. *J Current Med Res Opinion* 7, 2135–2157. doi: 10.52845/CMRO/2024/7-2-11
- Fallon, J., Kelly, J., and Kavanagh, K. (2012). Galleria mellonella as a model for fungal pathogenicity testing. *Methods Mol Biol* 845, 469–485. doi: 10.1007/978-1-61779-539-8_33
- Ferreira, A. V., Domínguez-Andrés, J., Merlo Pich, L. M., Joosten, L. A. B., and Netea, M. G. (2024). Metabolic Regulation in the Induction of Trained Immunity. *Semin Immunopathol* 46, 7. doi: 10.1007/s00281-024-01015-8
- Fneish, F. H., Abd El Galil, K. H., and Domiati, S. A. (2025). Evaluation of Single and Multi-Strain Probiotics with Gentamicin Against E. coli O157:H7: Insights from In Vitro and In Vivo Studies. *Microorganisms* 13, 460. doi: 10.3390/microorganisms13020460
- Forbinake, N. A., Ohandza, C. S., Fai, K. N., Agbor, V. N., Asonglefac, B. K., Aroke, D., et al. (2020). Mortality analysis of burns in a developing country: a CAMEROONIAN experience. *BMC Public Health* 20, 1269. doi: 10.1186/s12889-020-09372-3
- Fournier, A., Voirol, P., Krähenbühl, M., Bonnemain, C.-L., Fournier, C., Pantet, O., et al. (2016). Antibiotic consumption to detect epidemics of Pseudomonas aeruginosa in a burn centre: A paradigm shift in the epidemiological surveillance of Pseudomonas aeruginosa nosocomial infections. *Burns* 42, 564–570. doi: 10.1016/j.burns.2015.10.030
- Gan, Y., Tong, J., Zhou, X., Long, X., Pan, Y., Liu, W., et al. (2021). Hepatoprotective Effect of Lactobacillus plantarum HFY09 on Ethanol-Induced Liver Injury in Mice. *Front Nutr* 8, 684588. doi: 10.3389/fnut.2021.684588
- Garg, V., Velumani, D., Lin, Y.-C., and Haye, A. (2024). A comprehensive review of probiotic claims regulations: Updates from Asia-Pacific, United States, and Europe. *PharmaNutrition* 30, 100423. doi: 10.1016/j.phanu.2024.100423
- Gaudreau, C., Girouard, Y., Gilbert, H., Gagnon, J., and Bekal, S. (2008). Comparison of Disk Diffusion and Agar Dilution Methods for Erythromycin, Ciprofloxacin, and Tetracycline Susceptibility Testing of Campylobacter coli and for Tetracycline Susceptibility Testing of Campylobacter jejuni subsp. jejuni. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 4475–4477. doi: 10.1128/AAC.00767-08
- Gilbert, J., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J., Lynch, S. V., and Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nat Med* 24, 392–400. doi: 10.1038/nm.4517

- Gonzalez, M. R., Fleuchot, B., Lauciello, L., Jafari, P., Applegate, L. A., Raffoul, W., et al. (2016). Effect of Human Burn Wound Exudate on *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *mSphere* 1, e00111-15. doi: 10.1128/mSphere.00111-15
- Gooch, H. C. C., Labedan, M., Hall, L. J., and Maxwell, A. (2024). Transplanting human infant gut microbiome species into *Galleria mellonella*. *BMC Research Notes* 17, 123. doi: 10.1186/s13104-024-06785-w
- Guarnieri, A., Falcone, M., Brancazio, N., Mukhtar, F., Worku, A. T., Cutuli, M. A., et al. (2025). In vivo functional screening on innate immunity of lactic acid bacteria in *Galleria mellonella* preclinical model: comparative analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lentilactobacillus kefir*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 15. doi: 10.3389/fcimb.2025.1681687
- Guarnieri, A., Venditti, N., Cutuli, M. A., Brancazio, N., Salvatore, G., Magnifico, I., et al. (2024). Human breast milk isolated lactic acid bacteria: antimicrobial and immunomodulatory activity on the *Galleria mellonella* burn wound model. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 14. doi: 10.3389/fcimb.2024.1428525
- Han, X., Ding, S., Jiang, H., Liu, G., Fang, J., Ma, Y., et al. (2021). *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* Alleviate Intestinal Inflammation and Microbial Disorder Induced by ETEC in a Murine Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021. doi: 10.1155/2021/6867962
- Hao, D., and Nourbakhsh, M. (2021). Recent Advances in Experimental Burn Models. *Biology (Basel)* 10, 526. doi: 10.3390/biology10060526
- Hawwari, I., Rossnagel, L., Rosero, N., Maasewerd, S., Vasconcelos, M. B., Jentsch, M., et al. (2024). Platelet transcription factors license the pro-inflammatory cytokine response of human monocytes. *EMBO Molecular Medicine* 16. doi: 10.1038/s44321-024-00093-3
- Hedengren-Olcott, M., Olcott, M. C., Mooney, D. T., Ekengren, S., Geller, B. L., and Taylor, B. J. (2004). Differential activation of the NF-kappaB-like factors Relish and Dif in *Drosophila melanogaster* by fungi and Gram-positive bacteria. *J Biol Chem* 279, 21121–21127. doi: 10.1074/jbc.M313856200
- Hemarajata, P., and Versalovic, J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol* 6, 39–51. doi: 10.1177/1756283X12459294
- Henikoff, S., and Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10915–10919. doi: 10.1073/pnas.89.22.10915
- Hernández, D., Cardell, E., and Zárate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J Appl Microbiol* 99, 77–84. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02576.x
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66

- Hockett, K. L., and Baltrus, D. A. (2017). Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *J Vis Exp*, 55064. doi: 10.3791/55064
- Hong, S.-W., Choi, E.-B., Min, T.-K., Kim, J.-H., Kim, M.-H., Jeon, S. G., et al. (2014). An important role of α -hemolysin in extracellular vesicles on the development of atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 9, e100499. doi: 10.1371/journal.pone.0100499
- Hooijmans, C. R., and Ritskes-Hoitinga, M. (2013). Progress in Using Systematic Reviews of Animal Studies to Improve Translational Research. *PLOS Medicine* 10, e1001482. doi: 10.1371/journal.pmed.1001482
- Hossain, M. L., Hammer, K., Lim, L. Y., Hettiarachchi, D., and Locher, C. (2022). Optimisation of an agar overlay assay for the assessment of the antimicrobial activity of topically applied semi-solid antiseptic products including honey-based formulations. *Journal of Microbiological Methods* 202, 106596. doi: 10.1016/j.mimet.2022.106596
- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., et al. (2022a). Microbiota in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 7, 135. doi: 10.1038/s41392-022-00974-4
- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., et al. (2022b). Microbiota in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 7, 135. doi: 10.1038/s41392-022-00974-4
- Huang, C., Leavitt, T., Bayer, L. R., and Orgill, D. P. (2014). Effect of negative pressure wound therapy on wound healing. *Current Problems in Surgery* 51, 301–331. doi: 10.1067/j.cpsurg.2014.04.001
- Huang, X., Xu, M., Pan, W., Wang, M., Wu, X., Dai, S., et al. (2020). Antimicrobial and immunomodulatory responses of photodynamic therapy in *Galleria mellonella* model. *BMC Microbiol* 20, 196. doi: 10.1186/s12866-020-01882-9
- Idrees, M., Imran, M., Atiq, N., Zahra, R., Abid, R., Alreshidi, M., et al. (2022). Probiotics, their action modality and the use of multi-omics in metamorphosis of commensal microbiota into target-based probiotics. *Front Nutr* 9, 959941. doi: 10.3389/fnut.2022.959941
- Isenring, J., Bircher, L., Geirnaert, A., and Lacroix, C. (2023). In vitro human gut microbiota fermentation models: opportunities, challenges, and pitfalls. *Microbiome Res Rep* 2, 2. doi: 10.20517/mrr.2022.15
- Jahan, F., Chinni, S. V., Samuggam, S., Reddy, L. V., Solayappan, M., and Su Yin, L. (2022). The Complex Mechanism of the *Salmonella typhi* Biofilm Formation That Facilitates Pathogenicity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 6462. doi: 10.3390/ijms23126462
- Jan, A. T. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front. Microbiol.* 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01053
- Jeschke, M. G., van Baar, M. E., Choudhry, M. A., Chung, K. K., Gibran, N. S., and Logsetty, S. (2020). Burn injury. *Nat Rev Dis Primers* 6, 1–25. doi: 10.1038/s41572-020-0145-5
- Jiang, Z., Mak, T. W., Sen, G., and Li, X. (2004). Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3533–3538. doi: 10.1073/pnas.0308496101

- Johnston, P. R., and Rolff, J. (2015). Host and Symbiont Jointly Control Gut Microbiota during Complete Metamorphosis. *PLoS Pathog* 11, e1005246. doi: 10.1371/journal.ppat.1005246
- Jordan, C. K. I., and Clarke, T. B. (2024). How does the microbiota control systemic innate immunity? *Trends Immunol* 45, 94–102. doi: 10.1016/j.it.2023.12.002
- Kamel, M., Aleya, S., Alsubih, M., and Aleya, L. (2024). Microbiome Dynamics: A Paradigm Shift in Combatting Infectious Diseases. *J Pers Med* 14, 217. doi: 10.3390/jpm14020217
- Kaur, B., Balgir, P. P., Mittu, B., Kumar, B., and Garg, N. (2013). Biomedical Applications of Fermentacin HV6b Isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770. *Biomed Res Int* 2013, 168438. doi: 10.1155/2013/168438
- Kavanagh, K., and Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28, 101–112. doi: 10.1016/j.femsre.2003.09.002
- Kazek, M., Kaczmarek, A., Wrońska, A. K., and Boguś, M. I. (2019). Diet influences the bacterial and free fatty acid profiles of the cuticle of *Galleria mellonella* larvae. *PLoS One* 14, e0211697. doi: 10.1371/journal.pone.0211697
- Kim, D. Y., Park, J. Y., and Gee, H. Y. (2023). *Lactobacillus plantarum* ameliorates NASH-related inflammation by upregulating l-arginine production. *Experimental & Molecular Medicine* 55. doi: 10.1038/s12276-023-01102-0
- Kim, H. G., Kim, N.-R., Gim, M. G., Lee, J. M., Lee, S. Y., Ko, M. Y., et al. (2008). Lipoteichoic Acid Isolated from *Lactobacillus plantarum* Inhibits Lipopolysaccharide-Induced TNF- α Production in THP-1 Cells and Endotoxin Shock in Mice¹. *The Journal of Immunology* 180, 2553–2561. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2553
- Kiousi, D. E., Rathosi, M., Tsifintaris, M., Chondrou, P., and Galanis, A. (2021). Probiotics: Omics Technologies To Unravel the Role of Probiotics in Health and Disease. *Adv Nutr* 12, 1802–1820. doi: 10.1093/advances/nmab014
- Koh, J.-A., Le, M. H., Lee, H.-J., Min, J.-W., Kim, M. J., Kang, H.-C., et al. (2025). Extracellular vesicles derived from *Lactobacillus gasseri* GFC-1220 alleviate inflammation via the TLR4/NF- κ B signaling pathway in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Sci Rep* 15, 21381. doi: 10.1038/s41598-025-99160-z
- Köhler, G. (2015). Probiotics research in *Galleria mellonella*. *Virulence* 6, 3–5. doi: 10.1080/21505594.2014.998967
- Kordaczuk, J., Sułek, M., Mak, P., Śmiałek-Bartyzel, J., Hulas-Stasiak, M., and Wojda, I. (2023). Defence response of *Galleria mellonella* larvae to oral and intrahemocelic infection with *Pseudomonas entomophila*. *Dev Comp Immunol* 147, 104749. doi: 10.1016/j.dci.2023.104749
- Kousholt, B. S., Præstegaard, K. F., Stone, J. C., Thomsen, A. F., Johansen, T. T., Ritskes-Hoitinga, M., et al. (2023). Reporting of 3Rs Approaches in Preclinical Animal Experimental Studies—A Nationwide Study. *Animals (Basel)* 13, 3005. doi: 10.3390/ani13193005

Kovacs-Simon, A., Titball, R. W., and Michell, S. L. (2011). Lipoproteins of Bacterial Pathogens. *Infection and Immunity* 79, 548–561. doi: 10.1128/iai.00682-10

Kozakiewicz, D., Razim, A., Schabussova, I., and Górska, S. (2025). Immunomodulatory properties of probiotic extracellular vesicles- do they have the potential to fill the gap in therapeutic strategies for allergies? *Cell Commun Signal* 23, 549. doi: 10.1186/s12964-025-02532-1

Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 32, 9–15. doi: 10.1385/0-89603-268-X:9

Kurata, A., Kiyohara, S., Imai, T., Yamasaki-Yashiki, S., Zaima, N., Moriyama, T., et al. (2022). Characterization of extracellular vesicles from *Lactiplantibacillus plantarum*. *Sci Rep* 12, 13330. doi: 10.1038/s41598-022-17629-7

La Fata, G., Weber, P., and Mohajeri, M. H. (2018). Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins* 10, 11–21. doi: 10.1007/s12602-017-9322-6

Ladhani, H. A., Yowler, C. J., and Claridge, J. A. (2021). Burn Wound Colonization, Infection, and Sepsis. *Surgical Infections* 22, 44–48. doi: 10.1089/sur.2020.346

Lam, L. N., Brunson, D. N., Kajfasz, J. K., and Lemos, J. A. (2022). Methods for Using the *Galleria mellonella* Invertebrate Model to Probe *Enterococcus faecalis* Pathogenicity. *Methods Mol Biol* 2427, 177–183. doi: 10.1007/978-1-0716-1971-1_15

Lam, L. N., Savage, K. E., Shakir, C. N., and Lemos, J. A. (2025). Genome-wide analysis of *Enterococcus faecalis* genes that facilitate interspecies competition with *Lactobacillus crispatus*. *J Bacteriol* 207, e0043824. doi: 10.1128/jb.00438-24

Lange, A., Beier, S., Huson, D. H., Parusel, R., Iglauer, F., and Frick, J.-S. (2018). Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). *Genome Announc* 6, e01220-17. doi: 10.1128/genomeA.01220-17

Lauwereyns, J., Bajramovic, J., Bert, B., Camenzind, S., De Kock, J., Elezović, A., et al. (2024). Toward a common interpretation of the 3Rs principles in animal research. *Lab Anim* 53, 347–350. doi: 10.1038/s41684-024-01476-2

Leaper, D., Assadian, O., Hubner, N.-O., McBain, A., Barbolt, T., Rothenburger, S., et al. (2011). Antimicrobial sutures and prevention of surgical site infection: assessment of the safety of the antiseptic triclosan. *Int Wound J* 8, 556–566. doi: 10.1111/j.1742-481X.2011.00841.x

Lee, B.-H., Chen, Y.-Z., Shen, T.-L., Pan, T.-M., and Hsu, W.-H. (2023). Proteomic characterization of extracellular vesicles derived from lactic acid bacteria. *Food Chem* 427, 136685. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136685

Li, L., Bowling, S., McGeary, S. E., Yu, Q., Lemke, B., Alcedo, K., et al. (2023). A mouse model with high clonal barcode diversity for joint lineage, transcriptomic, and epigenomic profiling in single cells. *Cell* 186, 5183-5199.e22. doi: 10.1016/j.cell.2023.09.019

- Li, M., Mao, B., Tang, X., Zhang, Q., Zhao, J., Chen, W., et al. (2024). Lactic acid bacteria derived extracellular vesicles: emerging bioactive nanoparticles in modulating host health. *Gut Microbes* 16, 2427311. doi: 10.1080/19490976.2024.2427311
- Li, X., and Stark, G. R. (2002). NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 30, 285–296. doi: 10.1016/s0301-472x(02)00777-4
- Liang, Q., Zhou, W., Peng, S., Liang, Z., Liu, Z., Zhu, C., et al. (2025). Current status and potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria applied in the food industry. *Current Research in Food Science* 10, 100997. doi: 10.1016/j.crfs.2025.100997
- Liang, S., Wang, X., Li, C., and Liu, L. (2024). Biological Activity of Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides and Their Applications in the Food and Pharmaceutical Industries. *Foods* 13, 1621. doi: 10.3390/foods13111621
- Liang, W., Gao, Y., Zhao, Y., Gao, L., Zhao, Z., He, Z., et al. (2023). Lactiplantibacillus plantarum ELF051 Alleviates Antibiotic-Associated Diarrhea by Regulating Intestinal Inflammation and Gut Microbiota. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 16. doi: 10.1007/s12602-023-10150-x
- Ligoxygakis, P., Bulet, P., and Reichhart, J.-M. (2002). Critical evaluation of the role of the Toll-like receptor 18-Wheeler in the host defense of Drosophila. *EMBO Rep* 3, 666–673. doi: 10.1093/embo-reports/kvf130
- Liu, W., Wei, Y., Xiang, R., Dong, B., and Yang, X. (2025). Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides Unveiling Multifaceted Insights from Structure to Application in Foods and Health Promotion. *Foods* 14, 823. doi: 10.3390/foods14050823
- Loewa, A., Feng, J. J., and Hedtrich, S. (2023). Human disease models in drug development. *Nat Rev Bioeng* 1, 545–559. doi: 10.1038/s44222-023-00063-3
- Loh, J. M. S., Adenwalla, N., Wiles, S., and Proft, T. (2013). Galleria mellonella larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 4, 419–428. doi: 10.4161/viru.24930
- Lorian, V. (1988). Differences between in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 1600–1601.
- Lu, W., Shi, Y., Zhao, J., Ni, Z., Yao, T., Jia, Q., et al. (2020). Resveratrol inhibits bile acid-induced gastric intestinal metaplasia via the PI3K/AKT/p-FoxO4 signalling pathway. *Phytotherapy Research* 35. doi: 10.1002/ptr.6915
- Lynch, S. V., and Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med* 375, 2369–2379. doi: 10.1056/NEJMra1600266
- Ma, Z., Zuo, T., Frey, N., and Rangrez, A. Y. (2024). A systematic framework for understanding the microbiome in human health and disease: from basic principles to clinical translation. *Sig Transduct Target Ther* 9, 237. doi: 10.1038/s41392-024-01946-6
- Maestri, E. (2021). The 3Rs Principle in Animal Experimentation: A Legal Review of the State of the Art in Europe and the Case in Italy. *BioTech (Basel)* 10, 9. doi: 10.3390/biotech10020009

- Mahanta, D. K., Bhoi, T. K., Komal, J., Samal, I., Nikhil, R. M., Paschapur, A. U., et al. (2023). Insect-pathogen crosstalk and the cellular-molecular mechanisms of insect immunity: uncovering the underlying signaling pathways and immune regulatory function of non-coding RNAs. *Front Immunol* 14, 1169152. doi: 10.3389/fimmu.2023.1169152
- Maitz, J., Merlino, J., Rizzo, S., McKew, G., and Maitz, P. (2023). Burn wound infections microbiome and novel approaches using therapeutic microorganisms in burn wound infection control. *Advanced Drug Delivery Reviews* 196, 114769. doi: 10.1016/j.addr.2023.114769
- Manna, L., Rizzi, E., Bafile, E., Cappelleri, A., Ruscica, M., Macchi, C., et al. (2023). Lentilactobacillus kefir SGL 13 and Andrographis paniculata alleviate dextran sulfate sodium induced colitis in mice. *Front. Nutr.* 10. doi: 10.3389/fnut.2023.1072334
- Mannervik, M. (1999). Target genes of homeodomain proteins. *Bioessays* 21, 267–270. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199904)21:4%3C267::AID-BIES1%3E3.0.CO;2-C
- Marena, G. D., Thomaz, L., Nosanchuk, J. D., and Taborda, C. P. (2025). Galleria mellonella as an Invertebrate Model for Studying Fungal Infections. *J Fungi (Basel)* 11, 157. doi: 10.3390/jof11020157
- Maricic, N., and Dawid, S. (2014). Using the Overlay Assay to Qualitatively Measure Bacterial Production of and Sensitivity to Pneumococcal Bacteriocins. *J Vis Exp*, 51876. doi: 10.3791/51876
- Marinacci, B., D'Ambrosio, C., Vitale, I., Di Sotto, A., Cairone, F., Spano, M., et al. (2025). Biochemical and functional properties of vesicles from planktonic and biofilm phenotypes of Limosilactobacillus reuteri DSM 17938. *Sci Rep* 15, 18889. doi: 10.1038/s41598-025-03823-w
- Markowiak, P., and Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* 9, 1021. doi: 10.3390/nu9091021
- Maslova, E., Eisaiankhong, L., Sjöberg, F., and McCarthy, R. R. (2021). Burns and biofilms: priority pathogens and in vivo models. *npj Biofilms Microbiomes* 7, 1–9. doi: 10.1038/s41522-021-00243-2
- Maslova, E., Osman, S., and McCarthy, R. R. (2023). Using the Galleria mellonella burn wound and infection model to identify and characterize potential wound probiotics. *Microbiology (Reading)* 169, 001350. doi: 10.1099/mic.0.001350
- Maslova, E., Shi, Y., Sjöberg, F., Azevedo, H. S., Wareham, D. W., and McCarthy, R. R. (2020). An Invertebrate Burn Wound Model That Recapitulates the Hallmarks of Burn Trauma and Infection Seen in Mammalian Models. *Front. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.00998
- Mastromarino, P., Capobianco, D., Campagna, G., Laforgia, N., Drimaco, P., Dileone, A., et al. (2014). Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces. *Biometals* 27, 1077–1086. doi: 10.1007/s10534-014-9762-3
- Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., and Rotondo, J. C. (2023). Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells* 12, 184. doi: 10.3390/cells12010184

- Melo, N. R. de, Abdrahman, A., Greig, C., Mukherjee, K., Thornton, C., Ratcliffe, N. A., et al. (2013). Myriocin Significantly Increases the Mortality of a Non-Mammalian Model Host during *Candida* Pathogenesis. *PLOS ONE* 8, e78905. doi: 10.1371/journal.pone.0078905
- Melo-Marques, I., Cardoso, S. M., and Empadinhas, N. (2024). Bacterial extracellular vesicles at the interface of gut microbiota and immunity. *Gut Microbes* 16, 2396494. doi: 10.1080/19490976.2024.2396494
- Ménard, G., Rouillon, A., Cattoir, V., and Donnio, P.-Y. (2021). *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fcimb.2021.782733
- Menta, L. N. K., Law, S. K. K., and Tan, H. S. (2025). Exploring the impact of probiotic route of administration on its protective effects against pathogenic infection in *Galleria mellonella*. *Journal of the Royal Society of New Zealand* 55, 1610–1622. doi: 10.1080/03036758.2024.2353736
- Moghaddam, M. R. B., Tonk, M., Schreiber, C., Salzig, D., Czermak, P., Vilcinskas, A., et al. (2016). The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides. *Biological Chemistry* 397, 939–945. doi: 10.1515/hsz-2016-0157
- Moorthy, A. K., Huang, D.-B., Wang, V. Y.-F., Vu, D., and Ghosh, G. (2007). X-ray Structure of a NF- κ B p50/RelB/DNA Complex Reveals Assembly of Multiple Dimers on Tandem κ B Sites. *J Mol Biol* 373, 723–734. doi: 10.1016/j.jmb.2007.08.039
- Mount, M. P., Lira, A., Grimes, D., Smith, P. D., Faucher, S., Slack, R., et al. (2007). Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 27, 3328–3337. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5321-06.2007
- Moya-Andérico, L., Admella, J., Fernandes, R., and Torrents, E. (2020). Monitoring Gene Expression during a *Galleria mellonella* Bacterial Infection. *Microorganisms* 8, 1798. doi: 10.3390/microorganisms8111798
- Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskas, A., and Chakraborty, T. (2010). *Galleria mellonella* as a Model System for Studying *Listeria* Pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 310–317. doi: 10.1128/AEM.01301-09
- Muñoz-Echeverri, L. M., Benavides-López, S., Geiger, O., Trujillo-Roldán, M. A., and Valdez-Cruz, N. A. (2024). Bacterial extracellular vesicles: biotechnological perspective for enhanced productivity. *World J Microbiol Biotechnol* 40, 174. doi: 10.1007/s11274-024-03963-7
- Ñahui Palomino, R. A., Vanpouille, C., Costantini, P. E., and Margolis, L. (2021). Microbiota–host communications: Bacterial extracellular vesicles as a common language. *PLoS Pathog* 17, e1009508. doi: 10.1371/journal.ppat.1009508
- Neurath, M. F., Artis, D., and Becker, C. (2025). The intestinal barrier: a pivotal role in health, inflammation, and cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 10, 573–592. doi: 10.1016/S2468-1253(24)00390-X

- Ng, A., and Xavier, R. J. (2011). Leucine-rich repeat (LRR) proteins: integrators of pattern recognition and signaling in immunity. *Autophagy* 7, 1082–1084. doi: 10.4161/auto.7.9.16464
- Norman, G., Shi, C., Goh, E. L., Murphy, E. M., Reid, A., Chiverton, L., et al. (2022). Negative pressure wound therapy for surgical wounds healing by primary closure. *Cochrane Database Syst Rev* 2022, CD009261. doi: 10.1002/14651858.CD009261.pub7
- Nuutila, K., Grolman, J., Yang, L., Broomhead, M., Lipsitz, S., Onderdonk, A., et al. (2020). Immediate Treatment of Burn Wounds with High Concentrations of Topical Antibiotics in an Alginate Hydrogel Using a Platform Wound Device. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 9, 48–60. doi: 10.1089/wound.2019.1018
- Pan, W., Yao, X., Lin, L., Liu, X., Jin, P., and Ma, F. (2023). The Relish/miR-275/Dredd mediated negative feedback loop is crucial to restoring immune homeostasis of *Drosophila* Imd pathway. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 162, 104013. doi: 10.1016/j.ibmb.2023.104013
- Pang, A., Pu, S., Pan, Y., Huang, N., and Li, D. (2025). Short-chain fatty acids from gut microbiota restore Th17/Treg balance in rheumatoid arthritis: Mechanisms and therapeutic potential. *J Transl Autoimmun* 11, 100316. doi: 10.1016/j.jtauto.2025.100316
- Park, H., Chan, M. M., and Iritani, B. M. (2010). Hem-1: Putting the “WAVE” into actin polymerization during an immune response. *FEBS Lett* 584, 4923–4932. doi: 10.1016/j.febslet.2010.10.018
- Park, S., Mok, J., Yu, H.-M., An, H.-J., Choi, G.-H., Lee, Y.-S., et al. (2025). Comparative and pharmacological investigation of bEVs from eight Lactobacillales strains. *Sci Rep* 15, 27263. doi: 10.1038/s41598-025-12873-z
- Pereira, M. F., Rossi, C. C., da Silva, G. C., Rosa, J. N., and Bazzolli, D. M. S. (2020). *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathogens and Disease* 78, ftaa056. doi: 10.1093/femspd/ftaa056
- Pereira, T. C., de Barros, P. P., Fugisaki, L. R. de O., Rossoni, R. D., Ribeiro, F. de C., de Menezes, R. T., et al. (2018). Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *J Fungi (Basel)* 4, 128. doi: 10.3390/jof4040128
- Perrin, S. (2014). Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature* 507, 423–425. doi: 10.1038/507423a
- Petrone, F., Gizzi, C., Andriani, A., Martini, V., Sala, R., Abballe, A., et al. (2024). Investigation of Healthcare-Acquired Infections and Antimicrobial Resistance in an Italian Hematology Department before and during the COVID-19 Pandemic. *Microorganisms* 12, 1296. doi: 10.3390/microorganisms12071296
- Petronio Petronio, G., Cutuli, M. A., Magnifico, I., Venditti, N., Pietrangelo, L., Vergalito, F., et al. (2020). In Vitro and In Vivo Biological Activity of Berberine Chloride against Uropathogenic *E. coli* Strains Using *Galleria mellonella* as a Host Model. *Molecules* 25, 5010. doi: 10.3390/molecules25215010

- Petronio Petronio, G., Pietrangelo, L., Cutuli, M. A., Magnifico, I., Venditti, N., Guarnieri, A., et al. (2022). Emerging Evidence on *Tenebrio molitor* Immunity: A Focus on Gene Expression Involved in Microbial Infection for Host-Pathogen Interaction Studies. *Microorganisms* 10, 1983. doi: 10.3390/microorganisms10101983
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., and Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr* 10, S49–S66. doi: 10.1093/advances/nmy063
- Pound, P., and Ritskes-Hoitinga, M. (2018). Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *J Transl Med* 16, 304. doi: 10.1186/s12967-018-1678-1
- Qiu, P., Ishimoto, T., Fu, L., Zhang, J., Zhang, Z., and Liu, Y. (2022). The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Front Cell Infect Microbiol* 12, 733992. doi: 10.3389/fcimb.2022.733992
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., and Lereclus, D. (2012). The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *J Vis Exp*, 4392. doi: 10.3791/4392
- Regulation - 1924/2006 - EN - EUR-Lex (n.d.). Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1924/oj/eng> (Accessed July 28, 2025).
- Riera, N., Handique, U., Zhang, Y., Dewdney, M. M., and Wang, N. (2017). Characterization of Antimicrobial-Producing Beneficial Bacteria Isolated from Huanglongbing Escape Citrus Trees. *Front. Microbiol.* 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02415
- Righetto, G. M., Lopes, J. L. de S., Bispo, P. J. M., André, C., Souza, J. M., Andricopulo, A. D., et al. (2023). Antimicrobial Activity of an Fmoc-Plantaricin 149 Derivative Peptide against Multidrug-Resistant Bacteria. *Antibiotics (Basel)* 12, 391. doi: 10.3390/antibiotics12020391
- Rolhion, N., and Chassaing, B. (2016). When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371, 20150504. doi: 10.1098/rstb.2015.0504
- Rossoni, R. D., Fuchs, B. B., Barros, P. P. de, Velloso, M. dos S., Jorge, A. O. C., Junqueira, J. C., et al. (2017). *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. *PLOS ONE* 12, e0173332. doi: 10.1371/journal.pone.0173332
- Rybarczyk, M. M., Schafer, J. M., Elm, C. M., Sarvepalli, S., Vaswani, P. A., Balhara, K. S., et al. (2016). Prevention of burn injuries in low- and middle-income countries: A systematic review. *Burns* 42, 1183–1192. doi: 10.1016/j.burns.2016.04.014
- Saadh, M. J., Allela, O. Q. B., Ballal, S., Mahdi, M. S., Chahar, M., Verma, R., et al. (2025). The effects of microbiota-derived short-chain fatty acids on T lymphocytes: From autoimmune diseases to cancer. *Semin Oncol* 52, 152398. doi: 10.1016/j.seminoncol.2025.152398
- Saboktakin-Rizi, M., Hojjati, M., Behbahani, B. A., and Noshad, M. (2021). Identification of *Lactobacillus plantarum* TW29-1 isolated from Iranian fermented cereal-dairy product

- (Yellow Zabol Kashk): probiotic characteristics, antimicrobial activity and safety evaluation. *Journal of Food Measurement and Characterization* 15. doi: 10.1007/s11694-021-00846-5
- Safronova, L. A., Pylypiuk, Y. V., Skorochod, I. O., and Polova, Z. M. (2024). Probiotics and Their Potential for the Prevention and Treatment of Infections. *Mikrobiolohichni Zhurnal* 86, 74–91. doi: 10.15407/microbiolj86.06.074
- Salas-Jara, M. J., Ilabaca, A., Vega, M., and García, A. (2016). Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms* 4, 35. doi: 10.3390/microorganisms4030035
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., et al. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 649–667. doi: 10.1038/s41575-021-00440-6
- Sami Awayid, H., and Qassim Mohammad, S. (2022). Prevalence and Antibiotic Resistance Pattern of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Iraqi Hospitals. *Arch Razi Inst* 77, 1147–1156. doi: 10.22092/ARI.2022.357391.2031
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Ouwehand, A. C., Reid, G., Salminen, S., Cabana, M. D., et al. (2016). Probiotic use in at-risk populations. *J Am Pharm Assoc (2003)* 56, 680–686. doi: 10.1016/j.japh.2016.07.001
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 605–616. doi: 10.1038/s41575-019-0173-3
- Santarelli, G., Rosato, R., Cicchinelli, M., Iavarone, F., Urbani, A., Sanguinetti, M., et al. (2025). The activity of cell-free supernatant of *Lactobacillus crispatus* M247: a promising treatment against vaginal infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 15. doi: 10.3389/fcimb.2025.1586442
- Sarvari, M., Mikani, A., and Mehrabadi, M. (2020). The innate immune gene Relish and Caudal jointly contribute to the gut immune homeostasis by regulating antimicrobial peptides in *Galleria mellonella*. *Dev Comp Immunol* 110, 103732. doi: 10.1016/j.dci.2020.103732
- Scalfaro, C., Iacobino, A., Nardis, C., and Franciosa, G. (2017). *Galleria mellonella* as an in vivo model for assessing the protective activity of probiotics against gastrointestinal bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 364. doi: 10.1093/femsle/fnx064
- Schuhmann, B., Seitz, V., Vilcinskas, A., and Podsiadlowski, L. (2003). Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol* 53, 125–133. doi: 10.1002/arch.10091
- Schwechheimer, C., and Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 13, 605–619. doi: 10.1038/nrmicro3525
- Serrano, I., Verdial, C., Tavares, L., and Oliveira, M. (2023). The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. *Antibiotics* 12, 505. doi: 10.3390/antibiotics12030505

- Shah, A. B., Baiseitova, A., Zahoor, M., Ahmad, I., Ikram, M., Bakhsh, A., et al. (2024). Probiotic significance of *Lactobacillus* strains: a comprehensive review on health impacts, research gaps, and future prospects. *Gut Microbes* 16, 2431643. doi: 10.1080/19490976.2024.2431643
- Sharma, H., Nayak, N., Mal, P., Pal, R., Das, S., Mohanty, S., et al. (2025). Impact of NF- κ B Signaling and Sirtuin-1 Protein for Targeted Inflammatory Intervention. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 26. doi: 10.2174/0113892010301469240409082212
- Shayista, H., Prasad, M. N. N., Raj, S. N., Prasad, A., Lakshmi, S., Ranjini, H. K., et al. (2025). Complexity of antibiotic resistance and its impact on gut microbiota dynamics. *Engineering Microbiology* 5, 100187. doi: 10.1016/j.engmic.2024.100187
- Sheehan, G., Farrell, G., and Kavanagh, K. (2020). Immune priming: the secret weapon of the insect world. *Virulence* 11, 238–246. doi: 10.1080/21505594.2020.1731137
- Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., and Kavanagh, K. (2018). Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences ? *Virulence* 9, 1625–1639. doi: 10.1080/21505594.2018.1526531
- Sheehan, G., and Kavanagh, K. (2017). Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Virulence* 9, 163–172. doi: 10.1080/21505594.2017.1370174
- Shen, Y., Fan, N., Ma, S.-X., Cheng, X., Yang, X., and Wang, G. (2025). Gut Microbiota Dysbiosis: Pathogenesis, Diseases, Prevention, and Therapy. *MedComm (2020)* 6, e70168. doi: 10.1002/mco2.70168
- Shi, R., Liu, X., Ye, J., Zhao, Z., Xia, B., Wang, D., et al. (2023). *Lactobacillus plantarum* LLY-606 supplementation ameliorates hyperuricemia via modulating intestinal homeostasis and relieving inflammation. *Food & Function* 14. doi: 10.1039/d2fo03411e
- Shi, R., Ye, J., Wu, X., Fan, H., Wang, D., Liu, X., et al. (2024). *Lactobacillus plantarum* LLY-606 Supplementation Ameliorates the Cognitive Impairment of Natural Aging in Mice: The Potential Role of Gut Microbiota Homeostasis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 72. doi: 10.1021/acs.jafc.3c07041
- Sielaff, M., Kuharev, J., Bohn, T., Hahlbrock, J., Bopp, T., Tenzer, S., et al. (2017). Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range. *J Proteome Res* 16, 4060–4072. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00433
- Sim, E. A., Kim, S.-Y., Kim, S., and Mun, E.-G. (2025). Probiotic Potential and Enhanced Adhesion of Fermented Foods-Isolated Lactic Acid Bacteria to Intestinal Epithelial Caco-2 and HT-29 Cells. *Microorganisms* 13, 32. doi: 10.3390/microorganisms13010032
- Smith, B. O., Downing, A. K., Driscoll, P. C., Dudgeon, T. J., and Campbell, I. D. (1995). The solution structure and backbone dynamics of the fibronectin type I and epidermal growth factor-like pair of modules of tissue-type plasminogen activator. *Structure* 3, 823–833. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00217-9
- Smith, D. (2022). The Insect Melanization Response in *Galleria mellonella* is Directly Fungicidal. 1. doi: 10.17632/rd5fn5xbx8.1

- Smith, D. F. Q., and Casadevall, A. (2021). Fungal immunity and pathogenesis in mammals versus the invertebrate model organism *Galleria mellonella*. *Pathog Dis* 79, ftab013. doi: 10.1093/femspd/ftab013
- Song, W., Ko, J., Choi, Y. H., and Hwang, N. S. (2021). Recent advancements in enzyme-mediated crosslinkable hydrogels: In vivo-mimicking strategies. *APL Bioeng* 5, 021502. doi: 10.1063/5.0037793
- Spacova, I., Binda, S., ter Haar, J. A., Henoud, S., Legrain-Raspaud, S., Dekker, J., et al. (2023). Comparing technology and regulatory landscape of probiotics as food, dietary supplements and live biotherapeutics. *Front Microbiol* 14, 1272754. doi: 10.3389/fmicb.2023.1272754
- Stroud, J. C., Lopez-Rodriguez, C., Rao, A., and Chen, L. (2002). Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor. *Nat Struct Biol* 9, 90–94. doi: 10.1038/nsb749
- Sun, S.-C. (2017). The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 17, 545–558. doi: 10.1038/nri.2017.52
- Sutcliffe, I. C., and Harrington, D. J. (2002). Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology (Reading)* 148, 2065–2077. doi: 10.1099/00221287-148-7-2065
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., et al. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 687–701. doi: 10.1038/s41575-020-0344-2
- Tak, P. P., and Firestein, G. S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107, 7–11. doi: 10.1172/JCI11830
- Tang, H., Huang, W., and Yao, Y.-F. (2023). The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microb Cell* 10, 49–62. doi: 10.15698/mic2023.03.792
- Tang, Y.-T., Huang, Y.-Y., Zheng, L., Qin, S.-H., Xu, X.-P., An, T.-X., et al. (2017). Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int J Mol Med* 40, 834–844. doi: 10.3892/ijmm.2017.3080
- Teng, X., Zhang, T., and Rao, C. (2025). Novel probiotics adsorbing and excreting microplastics in vivo show potential gut health benefits. *Front. Microbiol.* 15. doi: 10.3389/fmicb.2024.1522794
- Tong, M., Jun, T., Nie, Y., Hao, J., and Fan, D. (2019). The Role of the Slit/Robo Signaling Pathway. *J Cancer* 10, 2694–2705. doi: 10.7150/jca.31877
- Torres, M., Pinzón, E. N., Rey, F. M., Martinez, H., Parra Giraldo, C. M., and Celis Ramírez, A. M. (2020). *Galleria mellonella* as a Novelty in vivo Model of Host-Pathogen Interaction for *Malassezia furfur* CBS 1878 and *Malassezia pachydermatis* CBS 1879. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10. doi: 10.3389/fcimb.2020.00199

- Torrey, J., Orr, J., and Florance, J. (2020). Rapid Deployment of National Guard Alternative Healthcare Facility With Isolation Unit Capabilities in Response to COVID-19. *Mil Med*, usaa546. doi: 10.1093/milmed/usaa546
- Tsai, C. J.-Y., Loh, J. M. S., and Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7, 214–229. doi: 10.1080/21505594.2015.1135289
- Tsakas, S., and Marmaras, V. J. (2010). Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Survival Journal* 7, 228–238.
- Uhegwu, C. C., and Anumudu, C. K. (2025). Probiotic Potential of Traditional and Emerging Microbial Strains in Functional Foods: From Characterization to Applications and Health Benefits. *Microorganisms* 13, 2521. doi: 10.3390/microorganisms13112521
- Upfold, J., Rejasse, A., Nielsen-Leroux, C., Jensen, A. B., and Sanchis-Borja, V. (2023). The immunostimulatory role of an Enterococcus-dominated gut microbiota in host protection against bacterial and fungal pathogens in *Galleria mellonella* larvae. *Front. Insect Sci.* 3. doi: 10.3389/finsc.2023.1260333
- Valentini, M., Piermattei, A., Di Sante, G., Migliara, G., Delogu, G., and Ria, F. (2014). Immunomodulation by Gut Microbiota: Role of Toll-Like Receptor Expressed by T Cells. *J Immunol Res* 2014, 586939. doi: 10.1155/2014/586939
- van der Worp, H. B., Howells, D. W., Sena, E. S., Porritt, M. J., Rewell, S., O’Collins, V., et al. (2010). Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med* 7, e1000245. doi: 10.1371/journal.pmed.1000245
- Venditti, N., Vergalito, F., Magnifico, I., Cutuli, M. A., Pietrangelo, L., Cozzolino, A., et al. (2021). The Lepidoptera *Galleria mellonella* “in vivo” model: a preliminary pilot study on oral administration of *Lactobacillus plantarum* (now *Lactiplantibacillus plantarum*). *New Microbiol* 44, 42–50.
- Vergalito, F., Bagnoli, D., Maiuro, L., Pannella, G., Palombo, V., Testa, B., et al. (2024). *Akkermansia muciniphila*: new insights into resistance to gastrointestinal stress, adhesion, and protein interaction with human mucins through optimised in vitro trials and bioinformatics tools. *Front Microbiol* 15, 1462220. doi: 10.3389/fmicb.2024.1462220
- Vergalito, F., Pietrangelo, L., Petronio Petronio, G., Colitto, F., Alfio Cutuli, M., Magnifico, I., et al. (2018). Vitamin E for Prevention of Biofilm-caused Healthcare-associated Infections. *Open Med (Wars)* 15, 14–21. doi: 10.1515/med-2020-0004
- Vertyporokh, L., and Wojda, I. (2020). Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 170, 107327. doi: 10.1016/j.jip.2020.107327
- Vidal, M., Arch, M., Fuentes, E., and Cardona, P.-J. (2024). *Drosophila melanogaster* experimental model to test new antimicrobials: a methodological approach. *Front. Microbiol.* 15. doi: 10.3389/fmicb.2024.1478263
- Vilcinskas, A., and Wedde, M. (2002). Insect inhibitors of metalloproteinases. *IUBMB Life* 54, 339–343. doi: 10.1080/15216540216040

- Vinayamohan, P., Joseph, D., Vijju, L. S., Baskaran, S. A., and Venkitanarayanan, K. (2024). Efficacy of Probiotics in Reducing Pathogenic Potential of Infectious Agents. *Fermentation* 10, 599. doi: 10.3390/fermentation10120599
- Vinderola, G., Sanders, M. E., and Salminen, S. (2022). The Concept of Postbiotics. *Foods* 11, 1077. doi: 10.3390/foods11081077
- Vogel, H., Altincicek, B., Glöckner, G., and Vilcinskas, A. (2011). A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genomics* 12, 308. doi: 10.1186/1471-2164-12-308
- Wang, G. (2014). Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals* 7, 545–594. doi: 10.3390/ph7050545
- Wang, L., Zhao, L., Niu, C., Li, S., Wang, C., Gao, L., et al. (2022). *Lactobacillus plantarum* DP189 Reduces α -SYN Aggravation in MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice via Regulating Oxidative Damage, Inflammation, and Gut Microbiota Disorder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70. doi: 10.1021/acs.jafc.1c07711
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., et al. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front Bioeng Biotechnol* 9, 612285. doi: 10.3389/fbioe.2021.612285
- Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., et al. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 13, e12404. doi: 10.1002/jev2.12404
- Wen, M., Wang, J., Ou, Z., Nie, G., Chen, Y., Li, M., et al. (2023). Bacterial extracellular vesicles: A position paper by the Microbial Vesicles Task Force of the Chinese Society for Extracellular Vesicles (3/2023). *Interdisciplinary Medicine* 1, e12046. doi: 10.1002/inmd.12046
- Williams, M. J., Rodriguez, A., Kimbrell, D. A., and Eldon, E. D. (1997). The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J* 16, 6120–6130. doi: 10.1093/emboj/16.20.6120
- Wojda, I. (2017). Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science* 24, 342–357. doi: 10.1111/1744-7917.12325
- Wolfe, S. A., Zhou, P., Dötsch, V., Chen, L., You, A., Ho, S. N., et al. (1997). Unusual Rel-like architecture in the DNA-binding domain of the transcription factor NFATc. *Nature* 385, 172–176. doi: 10.1038/385172a0
- Wollert, T., Pasche, B., Rochon, M., Deppenmeier, S., van den Heuvel, J., Gruber, A. D., et al. (2007). Extending the host range of *Listeria monocytogenes* by rational protein design. *Cell* 129, 891–902. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.049
- Xiao, M., Zhang, C., Duan, H., Narbad, A., Zhao, J., Chen, W., et al. (2024). Cross-feeding of bifidobacteria promotes intestinal homeostasis: a lifelong perspective on the host health. *npj Biofilms Microbiomes* 10, 47. doi: 10.1038/s41522-024-00524-6
- Xu, X., Qiao, Y., Peng, Q., Dia, V. P., and Shi, B. (2023). Probiotic activity of *Lactiplantibacillus plantarum* NA isolated from Chinese northeast sauerkraut and comparative

evaluation of its live and heat-killed cells on antioxidant activity and RAW 264.7 macrophage stimulation. *Food Funct.* 14, 2481–2495. doi: 10.1039/D2FO03761K

Yamamoto-Hino, M., and Goto, S. (2016). Spätzle-Processing Enzyme-independent Activation of the Toll Pathway in *Drosophila* Innate Immunity. *Cell Struct Funct* 41, 55–60. doi: 10.1247/csf.16002

Yang, D., Fu, X., He, S., Ning, X., and Ling, M. (2017). Analysis of Differentially Expressed Proteins in *Mycobacterium avium*-Infected Macrophages Comparing with *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Macrophages. *Biomed Res Int* 2017, 5103803. doi: 10.1155/2017/5103803

Yang, S., Xu, X., Peng, Q., Ma, L., Qiao, Y., and Shi, B. (2023). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, as an alternative to antibiotics, on regulation of intestinal health and the immune system. *Animal Nutrition* 13, 78–89. doi: 10.1016/j.aninu.2023.02.004

Yao, Y., Shang, W., Bao, L., Peng, Z., and Wu, C. (2024). Epithelial-immune cell crosstalk for intestinal barrier homeostasis. *Eur J Immunol* 54, e2350631. doi: 10.1002/eji.202350631

Yoo, J. Y., Groer, M., Dutra, S. V. O., Sarkar, A., and McSkimming, D. I. (2020). Gut Microbiota and Immune System Interactions. *Microorganisms* 8, 1587. doi: 10.3390/microorganisms8101587

Yu, P., Ke, C., Guo, J., Zhang, X., and Li, B. (2020). *Lactobacillus plantarum* L15 Alleviates Colitis by Inhibiting LPS-Mediated NF- κ B Activation and Ameliorates DSS-Induced Gut Microbiota Dysbiosis. *Frontiers in Immunology* 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.575173

Zeng, J., He, Z., Wang, G., Ma, Y., and Zhang, F. (2025). Interaction Between Microbiota and Immunity: Molecular Mechanisms, Biological Functions, Diseases, and New Therapeutic Opportunities. *MedComm (2020)* 6, e70265. doi: 10.1002/mco2.70265

Zhang, Z., Wei, H., Hu, Y., Zhang, N., Li, J., and Lu, J. (2024). Dietary supplementation with non-digestible isomaltooligosaccharide and *Lactiplantibacillus plantarum* ZDY2013 ameliorates DSS-induced colitis via modulating intestinal barrier integrity and the gut microbiota. *Food & function* 15. doi: 10.1039/d4fo00421c

Zhao, H., Wang, Q., Zhao, J., Wang, D., Liu, H., Gao, P., et al. (2024a). Ento-A alleviates DSS-induced experimental colitis in mice by remolding intestinal microbiota to regulate SCFAs metabolism and the Th17 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 170, 115985. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115985

Zhao, S., Lau, R., Zhong, Y., and Chen, M.-H. (2024b). Lactate cross-feeding between *Bifidobacterium* species and *Megasphaera indica* contributes to butyrate formation in the human colonic environment. *Appl Environ Microbiol* 90, e0101923. doi: 10.1128/aem.01019-23

Zheng, D., Liwinski, T., and Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res* 30, 492–506. doi: 10.1038/s41422-020-0332-7

Zielińska, D., and Kolożyn-Krajewska, D. (2018). Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *Biomed Res Int* 2018, 5063185. doi: 10.1155/2018/5063185