

ECOLOGIA DEL MICROBIOTA UMANO

DEFINIZIONE DI SPECIE E CEPPO TYPE

La specie è l'unità tassonomica di base e rappresenta l'insieme di ceppi simili che differiscono sufficientemente da altri gruppi di ceppi da giustificare il riconoscimento come unità tassonomica a sé stante. Ogni specie batterica possiede un ceppo *type*, ossia un ceppo di riferimento che riassume in sé tutte le caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei ceppi della specie che rappresenta. I batteri devono soddisfare tre caratteristiche per poter essere identificati come appartenenti ad una specie: elevata similarità fenotipica rispetto al ceppo *type* con almeno una proprietà distintiva nei confronti di altre specie, omologia DNA/DNA maggiore del 70% e omologia di sequenza del gene codificante il 16S rRNA maggiore del 98%.

16S rRNA

Il gene codificante per il 16S rRNA presenta regioni altamente conservate tra le diverse specie di procarioti, cioè raramente sottoposte a mutazioni di sequenza nel corso dell'evoluzione, e regioni variabili: ciò permette di stabilire le distanze filogenetiche tra i diversi gruppi tassonomici, dai livelli più alti sino a quelli di base, come la specie. Sulla base delle sequenze note del gene vengono preparati degli oligonucleotidi, detti primer panbatterici, che permettono di amplificare mediante PCR questo gene virtualmente da tutti i batteri.

MICROBIOTA e MICROBIOMA

Il microbiota rappresenta l'insieme dei microrganismi che vivono in un qualsiasi habitat. Il microbiota umano rappresenta circa l'1-3% della massa corporea ed è costituito principalmente da batteri, con un rapporto tra cellule batteriche e cellule umane di 1.3 a 1. Il microbioma, invece, rappresenta l'insieme dei geni e dei genomi dei membri di un microbiota; alternativamente, questo termine può essere utilizzato per indicare l'insieme di microrganismi, dei loro genomi e dell'ambiente ad essi circostante.

METAGENOMICA

La metagenomica è la disciplina che si occupa del sequenziamento di interi genomi grazie all'isolamento ed al sequenziamento del DNA direttamente estratto da campioni ambientali, vista l'impossibilità di isolamento della maggior parte dei microrganismi in coltura pura. In seguito alla purificazione del materiale genetico estratto, esso viene sequenziato su una delle piattaforme di sequenziamento di nuova generazione; tra queste la più utilizzata è Solexa-Illumina. Il materiale genetico può essere sequenziato *in toto* mediante *Shotgun Metagenomic Sequencing*, ossia mediante la rottura fisica del DNA in frammenti di grandezza casuale che vengono poi isolati in base alle dimensioni e ligati con oligonucleotidi *adapter* per l'attribuzione del significato biologico alle sequenze ottenute; alternativamente, il sequenziamento può essere limitato ad alcuni geni specifici, come quello codificante per il 16S rRNA, che vengono amplificati via PCR e miscelati con ampliconi per la ricerca di similarità nei database di biosequenze.

READS e OTU

Una *read* è un dato di sequenza nucleotidica corrispondente ad un frammento di DNA sequenziato che, nella microbiomica, può essere fatto corrispondere ad un determinato gruppo tassonomico: le *read* aventi similarità

minima del 97% vengono raggruppate in pacchetti, detti OTU (*Operational Taxonomic Unit*), e confrontate con le sequenze annotate presenti in specifici database, come Silva. Questa operazione permette di ottenere una OTU *table*, una tabella in cui ogni pacchetto di *read* avrà una designazione tassonomica ed un dato di abbondanza espresso come numero di *read* che la costituisce. Nella metagenomica, dopo il sequenziamento *shotgun*, le *read* vengono assemblate a formare le *contigs*, sequenze più lunghe sottoposte ad annotazione funzionale, ossia attribuzione del significato biologico: per fare ciò vengono confrontate le ORF (*Open Reading Frame*), ossia le regioni potenzialmente corrispondenti ad un gene, con le sequenze presenti nelle banche dati, come GenBank.

BIODIVERSITÀ

La classificazione tassonomica di un ecosistema consiste nello studio della biodiversità, espressa attraverso tre variabili: la *richness* è la misura del numero di differenti unità tassonomiche in un campione, la *evenness* è la misura dell'abbondanza di tali unità tassonomiche e l'abbondanza relativa è la misura del numero di ciascuna unità tassonomica (OTU) rispetto al numero totale (*read*).

Le curve di rarefazione sono diagrammi del numero di unità tassonomiche diverse (OTU) in funzione del numero totale (*read*) di individui di un ecosistema. Le curve di rarefazioni permettono di capire se un'analisi di microbiomica è stata in grado di coprire adeguatamente la diversità tassonomica intra-campione: ciò dipende dalla profondità di sequenziamento, cioè dal numero totale di sequenze (*read*) generate. Il campionamento viene generalmente protratto fino al raggiungimento di un plateau della curva.

La beta-diversità descrive la differenza o la similarità esistente nella composizione tassonomica di due ecosistemi microbici. Viene determinata utilizzando algoritmi filogenetici (UniFrac: può considerare o meno l'abbondanza relativa) e non (PCA, PCoA), a seconda che tengano in considerazione la distanza filogenetica tra i gruppi tassonomici o meno.

CARATTERISTICHE MICROBIOTA UMANO

Ogni habitat associato al corpo umano possiede dei taxa caratteristici: esiste quindi una forte specializzazione di nicchia. La variazione di una comunità all'interno di un individuo, inoltre, è costantemente inferiore a quella tra individui diversi: ciò implica un'elevata stabilità nel corso del tempo della composizione microbica di un individuo. La variazione dell'abbondanza relativa dei geni microbici tra gli individui è assai minore rispetto a quella tassonomica: ciò determina un'elevata stabilità funzionale o ridondanza funzionale del microbiota, ossia diversi batteri metabolicamente attivi che svolgono funzioni simili in individui diversi.

DISBIOSI

La disbiosi è definita come una qualsiasi perturbazione della normale struttura di un microbiota associato ad un ospite che potrebbe interrompere la relazione simbiotica tra l'ospite stesso e i microrganismi ad esso associati, promuovendo l'insorgenza di disfunzioni e/o malattie. Ciò implica un nesso causale tra disbiosi e malattia. La maggior parte degli studi ha dimostrato solo l'alterazione del microbiota in presenza della malattia e non il meccanismo che l'ha causata.

STABILITÀ ECOSISTEMA MICROBICO

I microbioti umani sono continuamente esposti a perturbazioni ambientali, ossia eventi esterni che provocano una pressione selettiva su di essi. Nonostante ciò, i microbioti associati all'uomo si mantengono in equilibrio dinamico:

ciò significa che si osservano solo fluttuazioni minori generalmente associate a funzioni distinte. Solitamente, il microbiota risulta resistente a perturbazioni di breve durata, o *pulse perturbation*: ciò significa che la comunità rimane invariata durante tale evento. In caso di perturbazioni costanti e protratte nel tempo, invece, la comunità può andare incontro a tre destini: recuperare più o meno efficientemente, in termini di velocità e quantità, la sua composizione tassonomica e funzionale iniziale (resilienza); adottare un equilibrio dinamico differente da quello iniziale, ma comunque benefico per l'organismo ospite (plasticità); incorrere in uno stato alternativo dannoso per l'ospite, spesso associato a perdita di biodiversità, che è a sua volta altamente resistente alle perturbazioni esterne (disbiosi).

BIOGEOGRAFIA DEGLI ECOSISTEMI BATTERICI DEL CORPO UMANO

Microbiota	Alfa	Beta	Spearman
Intestinale	+	+	+
Cutaneo	+	+	d
Vaginale	-	+	-
Orale	+	-	+

MICROBIOTA CUTANEO

La colonizzazione microbica della pelle è guidata dall'ecologia altamente variabile della superficie cutanea, sia tra individui diversi, sia tra i vari siti che la compongono. Nei siti umidi, come la fossa antecubitale, le ghiandole sudoripare agiscono sulla termoregolazione del corpo mediante l'evaporazione dell'acqua, processo che acidifica il pH *in situ* sfavorendo la colonizzazione di microrganismi patogeni; inoltre, il sudore escreto contiene varie molecole antimicrobiche, come acidi grassi liberi e peptidi antimicrobici. In questi habitat proliferano maggiormente i batteri dei generi *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. Nei siti oleosi, come la fronte, le ghiandole sebacee secernono il sebo ricco in lipidi, formando quindi un rivestimento idrofobico che lubrifica la cute e la protegge dalla colonizzazione di patogeni; questi habitat sono dominati dai batteri lipofili di *Propionibacterium*: *P. acnes*, ad esempio, presenta vari geni codificanti per lipasi che degradano il sebo cutaneo, rilasciando acidi grassi liberi che acidificano il pH per l'inibizione della crescita di patogeni, quali *S. aureus* e *S. pyogenes*, e l'induzione di quella di *S. epidermidis* e membri di *Corynebacterium*. Durante la pubertà, l'unità pilosebacea matura e, di conseguenza, batteri lipofili come *P. acnes* proliferano in eccesso, secernendo enzimi (lipasi, proteasi, ialuronidasi) che danneggiano il rivestimento tissutale e inducono risposte infiammatorie locali.

MICROBIOTA VAGINALE

Il microbiota vaginale possiede elevate variabilità e diversità inter-individuale, mentre una ridotta diversità intra-individuale. Rispetto agli altri mammiferi, infatti, il microbiota vaginale umano è dominato da batteri del genere *Lactobacillus* e ciò si pensa sia dovuto all'elevata capacità di questi di sfruttare il glucosio prodotto dall'idrolisi dell'amido, uno dei principali componenti della dieta umana, da parte di una alfa-amilasi presente nei fluidi della mucosa vaginale. Nella maggior parte delle donne appartenenti ad una determinata fascia di età, la comunità microbica vaginale presenta una composizione tassonomica riconducibile ad uno dei quattro *community state types*

(CST). Il CST-IV è una forma di disbiosi identificabile come vaginosi batterica asintomatica, in cui si presenta una maggior probabilità di: infezione da HIV in caso di esposizione al virus e successiva trasmissione dello stesso ad altri individui, infezione da altre malattie sessualmente trasmissibili (clamidia, gonorrea, herpes genitale), parto prematuro o aborto durante il periodo di gravidanza e incidenza della malattia infiammatoria pelvica. Il CST-IV è caratterizzato da una carenza di lattobacilli, che esplicano una serie di azioni fondamentali per l'inibizione dei patogeni: esclusione competitiva per nutrienti e siti di adesione, produzione di elementi antimicrobici come batteriocine e acido lattico, promozione dell'integrità epiteliale tramite la stimolazione della secrezione mucosa e delle *tight junction*, modulazione della risposta immunitaria indotta dal legame di componenti di parete (peptidoglicano, acidi lipoteicoici, esopolisaccaridi) ai recettori delle cellule immunitarie. *L. iners* è l'unico dei quattro lattobacilli vaginali principali ad esplicare un'azione dannosa nei confronti dell'ospite. Esso, infatti, non presenta il gene codificante per la D-lattato deidrogenasi e, di conseguenza, può solo produrre acido lattico nell'isomero L. L'acido D-lattico è in grado di de-regolare l'espressione della MMP8, la cui azione di degradazione della cervice provocherebbe la colonizzazione dei tratti superiori dei genitali da parte di patogeni.

MICROBIOTA ORALE

Sebbene venga studiato come unico, il microbiota orale si compone di circa 9 habitat che presentano caratteristiche anatomiche e fisiologiche divergenti e differiscono in relazione a: tensione d'ossigeno, disponibilità di nutrienti ed esposizione a fattori immunologici dell'ospite. Il processo di colonizzazione della cavità orale inizia immediatamente dopo il parto. Parto eutocico e allattamento al seno determinano un aumento rispettivamente della diversità tassonomica e dell'abbondanza di *Streptococcus* rispetto alle alternative possibili, ossia parto cesareo e allattamento artificiale. Già intorno ai 5 mesi, il microbiota orale del bambino differisce da quello materno ed è costituito principalmente da batteri dei generi: *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Veillonella*. L'eruzione dei primi denti e lo sviluppo delle fessure gengivali permettono ai microrganismi anaerobi stretti di entrare a far parte dell'ecologia orale sana. I bambini presentano una maggiore diversità ma un minor carico microbico rispetto ai genitori.

Nella cavità orale, i batteri sono organizzati in biofilm, matrici polimeriche generalmente auto-prodotte e adese ad una superficie all'interno delle quali convivono le varie comunità. Di queste, la placca dentale è la più rilevante poiché, a differenza delle superfici degli altri habitat orali, non è coperta da strati di cellule epiteliali fisiologicamente sottoposte a turnover ed è quindi più stabile. La placca dentale è costruita su una successione ecologica che inizia con il condizionamento della superficie del dente mediante deposizione di glicoproteine derivanti dalla saliva. A questa superficie condizionata aderiscono i colonizzatori primari, principalmente streptococchi, che iniziano a moltiplicarsi e vengono affiancati dai colonizzatori secondari: tra questi, *Fusobacterium nucleatum* funge da ponte per l'attacco dei microrganismi tardivi (*Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rictus*, *Eikella corrodens*, spirochete del genere *Treponema*). Le interazioni che si instaurano tra queste specie sono sia di natura strutturale che funzionale: *F. nucleatum*, ad esempio, produce tiamina e isobutirrato, che vengono utilizzati come fattori nutrizionali dalle spirochete. Tra i vari fattori, la dieta è in grado di regolare tali interazioni. Il saccarosio alimentare, ad esempio, fornisce un substrato per la sintesi di acidi organici da parte dei microrganismi acidogeni e la produzione di polisaccaridi extracellulari, come l'EPS, che formano una barriera difficile da penetrare: un basso pH all'interfaccia biofilm-dente determina, nel cronico, una perdita netta di minerali dallo smalto, portando allo sviluppo di una lesione cariosa. In questa situazione risultano benefici i batteri ureasi positivi, come *S. salivarius*, che, convertendo l'urea salivare in ammoniaca, determinano un innalzamento del pH e, conseguentemente, inibiscono il processo di demineralizzazione.

FIBRA ALIMENTARE

La fibra alimentare rappresenta la parte edibile delle piante o carboidrati analoghi (amido indigerito, polisaccaridi non amidacei, di-oligosaccaridi, polialcoli, mucina) che sono resistenti alla digestione e all'assorbimento

nell'intestino tenue umano, mentre vengono fermentati, in modo parziale o completo, dai batteri del microbiota dell'intestino crasso. Da questo processo originano gli acidi grassi a corta catena (SCFA), tre principalmente: il butirrato rappresenta una fonte energetica per le cellule epiteliali del crasso, promuove l'integrità della barriera intestinale e regola la risposta immunitaria inducendo l'espansione dei linfociti T regolatori; il propionato viene sfruttato principalmente a livello epatico come substrato nella gluconeogenesi e in reazioni di ossidazione; l'acetato è usato per la lipogenesi nel tessuto adiposo oppure viene ossidato nel tessuto muscolare. Il butirrato viene prodotto principalmente dai *Firmicutes* (*Clostridium leptum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Roseburia* spp.), mentre acetato e propionato da *Bacteroides*; *Roseburia inulinivorans* e *Coprococcus catus* sono in grado di produrre sia propionato che butirrato; *Anaerobutyricu*, *hallii* e *Anaerostipes* spp. sono in grado di produrre butirrato da lattato e acetato. Una carenza di carboidrati accessibili per il microbiota (MAC) induce un cambiamento nella composizione tassonomica (perdita di diversità e di *Bacteroides*) e funzionale (perdita di geni codificanti glicosil idrolasi) dello stesso. Tale alterazione viene mantenuta nelle generazioni successive e non può essere invertita con la reintroduzione di MAC. In uno studio comparativo del microbiota intestinale di bambini italiani (società industriale: dieta ricca in grassi e proteine animali, zuccheri e amido e povera in fibra) e burkinabè (società rurale: dieta povera in grassi e proteine animali e ricca in amido, fibre e polisaccaridi derivanti dalle piante), gli *Actinobacteria* e i *Bacteroidetes* risultavano molto più abbondanti nei secondi, mentre i primi si caratterizzavano per un'abbondanza di *Firmicutes* e *Proteobacteria*. I generi *Prevotella*, *Xylanibacter*, *Treponema* e *Butyrivibrio* erano presenti esclusivamente nei bambini africani: ciò permetteva loro di sfruttare xilani, xilosio e carbossimetilcellulosa per produrre elevate quantità di SCFAs. Inoltre, i bambini africani presentavano una più grande ricchezza e biodiversità microbica.

ECOSYSTEM SERVICE

L'*ecosystem service* descrive i vantaggi apportati dal microbiota all'organismo a cui è associato, come l'uomo, e viceversa. Le principali funzioni del microbiota intestinale sono: barriera contro la proliferazione di patogeni, regolazione della maturazione del sistema immunitario e sua modulazione, produzione di vitamine (folato, K, B) e regolazione della motilità intestinale. L'uomo fornisce al microbiota intestinale i nutrienti di cui necessita, in particolare polisaccaridi non digeribili enzimaticamente che vengono da esso fermentati.

PREBIOTICI

Un prebiotico è un costituente non vitale degli alimenti che conferisce un beneficio alla salute umana mediante la modulazione del microbiota. I carboidrati sono i prebiotici maggiormente utilizzati a livello industriale. *Bifidobacterium bifidum*, ad esempio, presenta nel proprio genoma una trentina di geni codificanti per enzimi coinvolti nei processi di metabolizzazione degli oligosaccaridi del latte e dei carboidrati alimentari, come la mucina; questo batterio è un ospite obbligato dell'intestino umano: ciò significa che nel corso del tempo la dieta umana, e nello specifico i carboidrati in essa contenuti, ha modulato la composizione del microbiota e del microbioma intestinali. Un altro esempio di questo processo è dato dall'elevata presenza di geni codificanti per porfirinasi e agarasi nel microbioma intestinale di individui giapponesi: ciò è dovuto ad un elevato consumo di alghe, contenenti porfirano e agarosio, nella dieta tradizionale giapponese; tali geni sembra siano stati acquisiti mediante trasferimento genico orizzontale dal batterio marino *Zobellia galactanivorans*.

OBESITÀ

Da studi condotti su coppie di topi gemelli, di cui uno magro ed uno obeso, è emerso che nei topi obesi il microbiota presenta un elevato rapporto *Firmicutes/Bacteroides* e il metagenoma è significativamente più ricco di geni che codificano per elementi di trasporto e metabolizzazione dei carboidrati non digeribili dalla dieta, implicando una

maggior capacità di recupero di energia da essi. Inoltre, in topi *germ-free* a cui viene trasferito il microbiota dei topi obesi si osserva un incremento percentuale del grasso corporeo totale significativamente maggiore rispetto a topi colonizzati dal microbiota di donatori magri. Ciò è dovuto all'esterificazione degli acidi grassi a lunga catena ottenuti dagli SCFAs prodotti in seguito a fermentazione microbica di polisaccaridi non digeribili dalla dieta; inoltre, l'aumento della produzione di acetato associato ad un eccesso calorico cronico determina l'attivazione del SN parasimpatico ed una conseguente secrezione aumentata di grelina, ormone che stimola l'appetito. Oltretutto, il microbiota è in grado di promuovere l'obesità modulando la risposta immunitaria: negli individui obesi, infatti, è stata osservata una carenza di *Akkermansia muciniphila*, un batterio dipendente dalla degradazione di mucina che è in grado di ridurre lo sviluppo di massa grassa, la resistenza insulinica e la dislipidemia grazie all'interazione della proteina di membrana esterna Amuc_1100 con il TLR2 degli enterociti intestinali.

ANTIBIOTICI

Gli antibiotici sono sostanze utilizzate per l'eliminazione di microrganismi patogeni. Tuttavia, anche i membri del microbiota intestinale possono essere inibiti da essi, soprattutto se si tratta di antibiotici ad ampio spettro d'azione: questi possono agire su un terzo dei taxa presenti, diminuendo significativamente la biodiversità del microbiota. Generalmente i gruppi batterici principali tornano ai livelli iniziali nell'arco di tempo di settimane o mesi, anche se alcuni taxa o funzioni possono essere persi in modo indefinito; nei casi peggiori si può incorrere anche in stati disbiotici, ossia acquisizione e diffusione di microrganismi patogeni e insorgenza di fenomeni di opportunismo. Nel breve termine ciò si traduce in: diarrea associata ad antibiotici (*K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. difficile*), maggiore suscettibilità alle infezioni, diffusione delle resistenze antibiotiche e alterazione della capacità fermentativa che porta a livelli ridotti di SCFAs (*C. albicans*). Gli effetti più drastici, ovvero quelli a lungo termine (obesità, sindrome metabolica, malattie autoimmuni e infiammatorie), si osservano nell'infanzia, soprattutto nei primi tre anni di vita, quando il microbiota è altamente influenzabile dai fattori esogeni. Gli effetti dannosi di determinati antibiotici, come l'aggravarsi di asma allergico in seguito ad assunzione di vancomicina (piuttosto che streptomina) o lo sviluppo di lesioni cutanee simili a dermatite atopica associato alla somministrazione di kanamicina (piuttosto che polimixina B), sono assenti o comunque ridimensionati negli individui adulti. I microrganismi che accumulano nel loro genoma numerosi geni di resistenza antibiotica sono detti superbatteri: ne sono un esempio i batteri New Delhi, che presentano l'enzima metallo-beta-lattamasi per la resistenza ad un ampio spettro di antibiotici, compresi i carbapenemi. I batteri acquisiscono questi geni di resistenza grazie al meccanismo di trasferimento genico orizzontale, ossia acquisizione di DNA eterologo mediante trasformazione, coniugazione o trasduzione. I fenotipi acquisiti si diffondono rapidamente nella popolazione solo se c'è pressione selettiva, ovvero solo se conferiscono un vantaggio evolutivo.

MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI

Le IBD sono un gruppo di condizioni infiammatorie del colon e del piccolo intestino di origine autoimmune. Le principali forme di IBD sono la malattia di Chron e la colite ulcerosa. La IBS, invece, è un disordine funzionale dell'intestino la cui causa organica è ignota; la diagnosi è basata solo su sintomi quali dolore addominale cronico, gonfiore, diarrea o stitichezza.

INFEZIONE DA *C. difficile*

La perdita di esclusione competitiva dovuta a trattamenti antibiotici ad ampio spettro (clindamicina, ampicillina, cefalosporine) porta alla proliferazione di ceppi farmaco-resistenti, come *C. difficile*; esso produce una tossina che causa gonfiore, diarrea ed eventualmente stimola la produzione di pseudomembrana (colite pseudomembranosa) da parte delle cellule intestinali che, se non viene rimossa chirurgicamente, porta alla morte del soggetto.

OLIGOSACCARIDI DEL LATTE

La colonizzazione microbica dell'intestino è un processo parallelo a quello di maturazione del sistema immunitario ed è influenzato da vari fattori esogeni. Tra questi, gli oligosaccaridi del latte materno (HMO) si sono dimostrati essere fattori prebiotici bifidogenici, cioè molecole in grado di promuovere selettivamente la crescita di bifidobatteri (*B. longum subsp. infantis*, *B. bifidum*), i costituenti principali del microbiota intestinale degli infanti che possiedono un ampio numero di geni codificanti enzimi deputati alla metabolizzazione di queste molecole. Gli HMO svolgono anche un'azione antimicrobica, poiché impediscono l'adesione di agenti patogeni alle mucose, abbassando il rischio di infezione, e modulano la risposta delle cellule immunitarie attraverso l'induzione di bifidobatteri; una carenza di questi ultimi, in caso di allattamento con biberon o assunzione di antibiotici, è associata a problematiche immunitarie. Inoltre, tra i cinque monosaccaridi che compongono gli HMO, l'acido sialico rappresenta una sostanza nutritiva potenzialmente essenziale per lo sviluppo del cervello e per la cognizione del nascituro. Gli HMO presentano differenze strutturali tra gli individui e ciò dipende dalla presenza di geni codificanti fucosil-transferasi nel genoma della madre; anche il sistema dei gruppi sanguigni di Lewis dipende dalla dotazione genetica per questi enzimi, quindi la composizione degli HMO riflette quella di tali gruppi. Il colostro ne contiene 20-25 g/L e nel corso dell'allattamento la concentrazione diminuisce fino a 5 g/L.

TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE

Il TMF consiste in multiple infusioni di microrganismi presenti nelle feci (diluite, omogeneizzate e filtrate) di un donatore sano (trattato con lassativi) nell'intestino di un soggetto ricevente (lavaggio intestinale) con problematiche associate ad una disbiosi intestinale. Questo trattamento, però, può presentare effetti negativi a lungo termine sul ricevente, come un eccessivo accumulo di grasso in caso di donatore sovrappeso o obeso. Per questo motivo è sempre più comune l'impiego di feci sintetiche, ossia combinazioni di batteri innocui/commensali intestinali.

PRODUZIONE DI COMPOSTI TOSSICI

Il metabolismo microbico delle molecole alimentari o farmacologiche può svilupparsi in tre sensi: attivazione (riduzione della sulfasalazina) o inattivazione (idrolisi del metotrexato) di un composto o produzione di composti tossici. La melamina è un composto industriale usato come materia prima per la realizzazione di polimeri e può finire nella catena alimentare se utilizzata per sofisticare i mangimi animali, nei quali simula una maggiore presenza proteica. Si tratta di un composto con un basso livello di tossicità, che può però alzarsi in seguito alla formazione di complessi insolubili con l'acido cianurico che interferiscono con la funzionalità renale. Ciò può avvenire quando nel microbiota intestinale è presente *Klebsiella terrigena*, un batterio che produce acido cianurico; fortunatamente questa specie è presente solo nell'1% della popolazione. Più spesso, la formazione di composti tossici si osserva in seguito a reazioni catalizzate da batteri enzimatici.

- **Nitroreduktasi** di *Escherichia* e *Clostridium*: riducono il gruppo nitro di varie molecole, formando intermedi N-idrossilati e altri composti (ammine aromatiche) mutageni e cancerogeni.
- **Azoreduktasi**: riducono il gruppo azo di alcuni composti, come il colorante Brown FK (E154), a gruppi amminici, determinandone quindi la tossicità (mutageno, miotossico nel caso citato).
- **Colesterolo DH**: riduce il colesterolo a coprostanone e altre molecole cancerogene.
- **Beta-glucuronidasi** codificate dal gene *uidA*: idrolizzano il legame glicosidico che lega i glucuronidi a molecole altamente tossiche, come le ammine eterocicliche glucuronidate a livello epatico ed escrete nel lume intestinale con la bile, liberandole e riattivandole di conseguenza.
- **7-alfa-deidrossilasi**: converte l'acido colico in deossicolico e l'acido chenodesossicolico in litocolico, due acidi biliari secondari poco solubili, epatotossici e cancerogeni; una dieta ad elevato contenuto di grassi induce ad

un aumento dei geni del microbiota codificanti per la 7-alfa-deidrossilasi, determinando un conseguente aumento dei livelli di acido deossicolico, il quale induce un fenotipo secretorio senescenza-associato nelle cellule stellate epatiche, che secernono quindi vari fattori infiammatori e promotori dell'insorgenza di tumori nel fegato.

SISTEMA IMMUNITARIO

La *oral tolerance* è un processo attivo di insensibilità immunitaria locale e sistemica agli antigeni ingeriti per via orale. La barriera intestinale è definita come l'unità funzionale che pone in costante equilibrio l'imponente carica antigenica del lume intestinale con la complessa organizzazione immunologica e non della mucosa intestinale.

Gli SCFAs sono in grado di legare *G-protein coupled receptors* posti sulla superficie di cellule del SI, inducendo una risposta antinfiammatoria, e di stimolare le cellule cromaffini a produrre serotonina che ha effetti benefici sulla motilità intestinale. I batteri filamentosi segmentati dell'ordine *Clostridiales* inducono l'espansione di linfociti TH17 nella lamina propria della mucosa intestinale e la conseguente produzione di IL-17 e IL-22, citochine che sono in grado di contrastare la colonizzazione da parte di microrganismi patogeni; inoltre, la loro presenza nell'intestino è correlata ad una maggiore resistenza verso il patogeno intestinale *Citrobacter rodentium*. L'iper-proliferazione dei TH17, però, può anche causare danni all'organismo ospite, come nel caso di ipertensione arteriosa favorita dal rilascio di IL-17 da parte di tali linfociti; in questi casi, tuttavia, il triptofano esogeno può essere convertito da *Lactobacillus murinus* in acido indol-3-acetico e indol-3-lattico, composti che prevengono la differenziazione dei linfociti T in TH17. Una dieta ad elevato contenuto salino può inibire la proliferazione del batterio e quindi causare ipertensione arteriosa anche attraverso questo meccanismo. Il polisaccaride zwitterionico PSA, che costituisce la capsula di *B. fragilis*, è in grado di legare i recettori CD4+, inducendo l'espressione dei linfociti TH1 e della IL-10 antinfiammatoria e riducendo la produzione di altre citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , TNF α , IL-23).

TEORIA DELLO SVUOTAMENTO DEL BIOMA

Il sistema immunitario risulta immaturo alla nascita e viene modulato dai microrganismi presenti nell'ambiente con cui viene a contatto. Questa continua esposizione lo educa ad instaurare sia meccanismi di tolleranza nei confronti delle proprie cellule, degli antigeni alimentari e dei microrganismi commensali, sia processi infiammatori in presenza di patogeni. Una sempre minore esposizione degli infanti ai microrganismi ambientali ha portato ad una più frequente insorgenza di malattie autoimmuni e infiammatorie e allergie. Ciò è dovuto proprio ad uno sbilancio nel processo di priming linfocitario verso popolazioni TH2 piuttosto che TH1. Ne è un esempio l'insorgenza quattro volte maggiore di allergie nella zona finlandese della regione Karelia rispetto alla zona russa: in quest'ultima, infatti, si riscontra un contenuto microbico generalmente più alto nelle abitazioni e la cute degli individui è colonizzata da batteri del genere *Acinetobacter*, correlati alla presenza della IL-10 antinfiammatoria nelle cellule mononucleate del sangue. Tuttavia, in Giappone, un Paese altamente industrializzato, questo fenomeno non si osserva: ciò è dovuto al consumo di una dieta tradizionale ricca in cibi fermentati e pesce, elementi che comportano un *intake* più alto di fibre, omega-3 e microrganismi. Esistono comunque alcuni prodotti arricchiti di microrganismi benefici, come alcuni integratori e latti fermentati addizionati con *L. johnsonii*: esso può conferire protezione alle vie aeree quando integrato oralmente.

METABOLITI DEL TRIPTOFANO

Nel tratto gastro-intestinale, il triptofano può subire tre destini: trasformazione diretta da parte del microbiota in diverse molecole, come gli acidi indol-3-acetico e indol-3-lattico, fondamentali nel prevenire la differenziazione dei linfociti T in TH17; formazione di serotonina nelle cellule cromaffini tramite triptofano idrossilasi 1; conversione in

chinurenina, un precursore della sintesi di niacina (vitamina B3) prodotta dal microbiota colonico. La niacina presenta lo stesso recettore del butirrato, il Gpr109A, la cui assenza, dovuta ad una possibile carenza di fibre alimentari nella dieta dell'individuo, determina l'insorgere di due processi dannosi che possono portare alla formazione di polipi intestinali: un eccesso di linfociti TH17 a discapito dei Treg produttori della IL-10 antiinfiammatoria; espansione dei batteri della famiglia delle *Prevotellaceae* e dei gram positivi TM7.

FIBRE SOLUBILI

Fibre solubili come inulina e pectina vengono efficacemente fermentate dai batteri presenti nell'intestino generando metaboliti come gli SCFAs e le vitamine che esplicano effetti positivi sulla salute dell'ospite. Una dieta ricca in fibre solubili, però, può portare ad un eccesso di fermentazione intestinale, elevata bilirubinemia ed eventualmente a cancro al fegato. La somministrazione di antibiotici o di una dieta ricca in cereali, composta quindi da ingredienti integrali naturali macinati, però, non risulta in cancro al fegato, dunque le fibre solubili esplicano il proprio effetto mediante il microbiota.

ATEROSCLEROSI

Carnitina e colina sono due molecole introdotte in grandi quantità con gli alimenti di origine animale e svolgono il ruolo di *carrier* degli acidi grassi e di costituenti fondamentali di membrane cellulari e neurotrasmettitori amminici, rispettivamente. Entrambe possono essere trasformate in trimetilammina (TMA) da enzimi batterici intestinali distribuiti in modo non tassonomico, rispettivamente una ossigenasi *Rieske-type* e colina-TMA liasi. La TMA viene assorbita dall'intestino e raggiunge il fegato, dove viene convertita in ossido di trimetilammina (TMAO) dagli enzimi flavina monossigenasi. Il TMAO induce l'accumulo di colesterolo nei macrofagi, l'accumulo di cellule schiumose nelle arterie e, conseguentemente, l'aterosclerosi.

ENTEROTIPI

Esiste un limitato numero di stati ospite/microbiota ben bilanciati, detti enterotipi, che possono rispondere diversamente all'assunzione di alimenti e farmaci. Nel 2011 sono stati descritti tre enterotipi: *Bacteroides* (enterotipo I), *Prevotella* (enterotipo II), *Ruminococcus* (enterotipo III). Ogni enterotipo utilizza specifici *pathways* metabolici per la formazione di energia in base alla tipologia di substrato disponibile nel colon: in altre parole, l'ingestione di determinati macronutrienti determina la composizione del microbiota. L'enterotipo II è associato ad una abbondante assunzione di carboidrati che vengono metabolizzati dalle specie appartenenti alla categoria attraverso la glicolisi e la via dei pentoso fosfati; gli enterotipi I e III sono associati a una dieta ricca in grassi e/o proteine.

ADDITIVI ALIMENTARI

Il numero di additivi alimentari approvati e utilizzati nell'industria alimentare è aumentato vertiginosamente negli ultimi decenni, soprattutto perché la valutazione del rischio di tali sostanze generalmente non include gli effetti sul microbiota intestinale. I dolcificanti artificiali non calorici (NAS) (saccarina, acesulfame di potassio, sucralosio, aspartame, neotame, advantame) hanno effetti batteriostatici e possono quindi modulare la composizione del microbiota intestinale promuovendo l'intolleranza al glucosio e il diabete mellito di tipo II; anche il rebaudioside A presente nella stevia naturale presenta proprietà batteriostatiche simili. Gli emulsionanti (carbossilimetilcellulosa, polisorbato-80), molecole simili a detersivi e molto comuni negli alimenti trasformati, sono in grado di promuovere l'infiammazione intestinale mediante due processi: erosione dello spessore mucoso con avvicinamento dei batteri

all'epitelio intestinale e riduzione dell'alfa-diversità a favore dei proteobatteri pro-infiammatori dei generi *Bilophila* ed *Helicobacter*. Gli emulsionanti possono quindi indurre colite nei soggetti suscettibili (*knockout* geni codificanti per IL-10 e TLR-5) e infiammazione cronica di basso grado nel resto dei soggetti. Questi elementi possono anche favorire la sindrome metabolica attraverso una ridotta produzione di butirrato ed un aumento dei livelli di alcuni acidi biliari; questi ultimi favoriscono la proliferazione di vari batteri patogeni (*Giardia*, *L. monocytogenes*, *H. hepaticus*).

LIPIDI DEL LATTE

Vista l'elevata idrofobicità dei grassi saturi del latte, essi sono particolarmente difficili da emulsionare, dunque promuovono la produzione epatica di acidi biliari, più efficienti nella formazione di micelle e quindi nell'emulsione dei grassi, coniugati alla taurina. Proprio quest'ultima determina la proliferazione di *B. wadsworthia* in quanto rappresenta l'accettore finale di elettroni nella respirazione anaerobica; grazie ad un complesso di quattro enzimi, il batterio la converte poi in ammoniaca, acetato e solfuro di idrogeno: quest'ultimo danneggia la mucosa e determina infiammazione (colite) in ospiti suscettibili. Inoltre, l'aumentata produzione di acidi biliari favorisce la proliferazione di vari batteri patogeni (*Giardia*, *L. monocytogenes*, *H. hepaticus*).