



**Microbiota e Funzione di Barriera**  
**PROXIAN®**  
**Monografia di Prodotto**

PACINI  
EDITORE  
MEDICINA

# Indice

## 1. Il microbiota intestinale

Composizione fisiologica nelle diverse età	3
Un ecosistema dinamico	4
Dieta e microbiota	4
Dialogo con il sistema immunitario	6
(programming, tolleranza, regolazione)	6
La tolleranza immunitaria	6

## 2. Microbiota e funzione di barriera

Importanza della barriera intestinale come direttore d'orchestra dei vari sistemi	7
Eubiosi e disbiosi	9
Implicazioni metaboliche	10
Obesità	10
Diabete	10
Epatosteatosi	10
Aterosclerosi	10
Effetto sul muscolo	13
Effetto sulla funzionalità renale	14
Relazione tra microbiota intestinale e cervello	14
Modulazione della flogosi	18
Effetto antiossidante	18

## 3. I probiotici

Effetto su organi e sistemi	19
Dieta	19
Antibiotici	19
Prebiotici	19
Simbiotici	19
Trapianto di microbiota	19
Probiotici	19
Effetti dei probiotici nelle condizioni patologiche	20
Microincapsulazione: nuova metodica di preparazione dei probiotici	23
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP01	24
Diversità genomica e versatilità	24
Effetto sul sistema immunitario e implicazioni sistemiche	25
Effetti del ceppo batterico <i>L. plantarum</i> LP01 sulle differenti sottopopolazioni cellulari	26
<i>Lactobacillus buchneri</i> Lb26	27
Internalizzazione di selenio e zinco	27
<i>Bifidobacterium lactis</i> BS05	28
Azione antiossidante	28
PROXIAN®	29
Caratteristiche del prodotto	29

*Direttore Responsabile*  
Patrizia Alma Pacini

*Edizione*  
Pacini Editore Srl  
Via A. Gherardesca 1 • 56121 Pisa  
Tel. 050 313011 • Fax 050 3130300  
info@pacinieditore.it • www.pacnimedicina.it

*Marketing Dept Pacini Editore Medicina*  
Andrea Tognelli  
Medical Projects and Publishing Director  
Tel. 050 3130255 • atognelli@pacinieditore.it  
Fabio Poponcini  
Sales Manager • Tel. 050 3130218 • fpoponcini@pacinieditore.it  
Alessandra Crosato  
Junior Sales Manager • Tel. 050 31 30 239 • acrosato@pacinieditore.it  
Manuela Mori  
Advertising Manager • Tel. 050 3130217 • mmori@pacinieditore.it

*Redazione*  
Lucia Castelli  
Tel. 050 3130224 • lcastelli@pacinieditore.it

*Grafica e impaginazione*  
Massimo Arcidiacono  
Tel. 050 31 30 231 • marcidiacono@pacinieditore.it

*Stampa*  
Industrie Grafiche Pacini • Pisa

© Copyright by Pacini Editore Srl • Pisa

Registrazione al Tribunale di Pisa n. 23 del 12/12/1998  
Quaderni di Medicina e Chirurgia 2018, suppl. 2 al n. 2  
L'editore resta a disposizione degli aventi diritto con i quali non è stato possibile comunicare e per le eventuali omissioni.  
Le fotocopie per uso personale possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun volume/fascicolo di periodico dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633. Le riproduzioni effettuate per finalità di carattere professionale, economico o commerciale o comunque per uso diverso da quello personale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da AIDRO, Corso di Porta Romana n. 108, Milano 20122, e-mail [segreteria@aidro.org](mailto:segreteria@aidro.org) e sito web [www.aidro.org](http://www.aidro.org)



Finito di stampare nel mese di Luglio 2018  
presso le Industrie Grafiche della Pacini Editore Srl  
Via A. Gherardesca • 56121 Ospedaletto • Pisa  
Telefono 050 313011 • Telefax 050 3130300  
[www.pacnimedicina.it](http://www.pacnimedicina.it)

## 1. Il microbiota intestinale

### Composizione fisiologica nelle diverse età

L'essere umano è un "superorganismo a prevalenza microbiica": il corpo dell'uomo è colonizzato da una serie di ecosistemi, con una specificità di nicchia, ovvero un **insieme di microrganismi, batteri** (microbiota), **virus** (virobiota), **funghi** (micobiota) **che convivono** pacificamente e **in modo simbiotico con l'ospite** (Dietert, 2014).

Si dovrebbe più propriamente riferirsi a diversi microbioti in funzione delle aree corporee colonizzate, tuttavia quello che focalizza maggiormente l'attenzione è il microbiota intestinale, alla cui componente micobica si fa generalmente riferimento essendo la più studiata e la più importante da un punto di vista funzionale.

**Il microbiota umano consiste di una biomassa enorme, del peso di circa 1,5-2 kg e composta da circa cento trilioni (10<sup>14</sup>) di cellule batteriche**, numero che è dieci volte superiore a quello delle cellule procariotiche che costituiscono l'organismo adulto. (Marchesi et al., 2016).

L'enorme mole di microrganismi implica anche la presenza di una vasta informazione genetica portata dal microbiota, indicata come microbioma, che è circa 150 volte più ampia del genoma umano e che rappresenta una fonte imponente di funzionalità, molte delle quali non sviluppate dall'ospite e quindi da questo acquisite (Lee et al., 2010).

Oggi è ormai acquisito che nell'intestino risiedono microbiomi caratteristici di ogni tratto gastrointestinale (Fig. 1).

Il microbiota è un ecosistema a stretto contatto con la mucosa intestinale, che ha un'area di circa 250 m<sup>2</sup> (Aureli et al., 2011). La complessità micobica testimoniata dal numero di microrganismi comporta difficoltà rilevanti per lo studio dei singoli componenti, dato che solo il 30% cresce in coltura. Le metodologie microbiologiche tradizionali risultano quindi inefficaci per la caratterizzazione di questo ecosistema.

Le informazioni relative alla composizione del microbiota intestinale sono comunque accessibili grazie alle tecniche di filogenetica molecolare coltura-indipendenti (*Next Generation Sequencing*, NGS) che si basano sullo studio dell'operone ribosomiale, in particolare del gene che codifica per l'rRNA 16S. È quindi possibile estrarre il DNA di tutti i batteri presenti in un campione fecale o di contenuto intestinale e amplificare tutti i geni rRNA 16S presenti mediante PCR (Qin et al., 2010). Queste tecnologie permettono di rispondere a una domanda di tipo tassonomico perché permettono di determinare la variazione dell'abbondanza relativa dei microrganismi, cioè la percentuale presente delle diverse specie micobiche. Un'altra tipologia di studio, più complessa e costosa, riguarda il sequenziamento dell'intero genoma, ovvero uno studio metagenomico funzionale che permette di valutare le attività dei microrganismi in termini di pattern metabolici presenti a livello intestinale.

Mediante questi approcci sofisticati è stato possibile studiare l'enorme diversità filogenetica del microbiota: **sono state infatti caratterizzate oltre 1.000 specie batteriche come possibili abitanti del tratto gastrointestinale**. Ogni individuo alberga circa 160 specie batteriche differenti (delle oltre 1.000) e **degli oltre 100 phyla batterici conosciuti, nell'intestino**



**Figura 1.**

Composizione e concentrazioni luminali di specie micobiche dominanti in varie regioni del tratto gastrointestinale.

**ne sono rappresentati solo 6.** Due di questi **i Firmicutes e i Bacteroidetes rappresentano, insieme, il 90% dell'intero microbiota** intestinale, gli altri phyla, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*, costituiscono il 10%.

*Firmicutes* è il phylum batterico più numeroso e raggruppa più di 200 generi, compresi *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacillus* e *Clostridium*, assai comuni nel microbiota intestinale (Qin et al., 2010).

**La normale interazione fra microbi intestinali e il loro ospite umano è un rapporto benefico per entrambi:** l'ospite mette a disposizione un habitat ricco di nutrienti e il microbiota, che agisce come un vero e proprio "organo metabolico", conferisce elementi utili alla salute umana (Tremaroli et al., 2012). **Grazie alle funzioni metaboliche svolte dal microbiota intestinale, l'ospite è in grado di utilizzare molte fonti energetiche**, come quelle derivanti dalla rottura di complessi non digeribili di carboidrati e proteine introdotti con la dieta. Inoltre, **i batteri intestinali sono in grado di influenzare l'assorbimento di ioni, sono coinvolti nella conversione di componenti polifenolici, sintetizzano vitamine (per esempio vitamina K e vitamine del complesso B), aminoacidi e acidi grassi a catena corta (Short Chain Fatty Acids, SCFA) come acetato, butirrato e propionato**. Il butirrato, in particolare, riveste una funzione centrale come principale fonte di energia per i colonociti. In più, il butirrato esercita proprietà anti-infiammatorie.

Un'ulteriore funzione dei microrganismi componenti il **microbiota** riguarda la **prevenzione della colonizzazione della mucosa da parte dei patogeni**. Questo effetto è spesso chia-

mato "resistenza alla colonizzazione" ed è ottenuto attraverso diversi meccanismi come la competizione per i nutrienti e i siti di legame, la produzione di batteriocine, la modifica del pH intestinale e la promozione e riparazione dell'integrità della barriera mucosa, formata da batteri, muco e cellule epiteliali, che costituisce un importante sistema di difesa nei confronti dei fattori potenzialmente immunogenici o patogeni presenti nel lume (v. capitolo 2).

### Un ecosistema dinamico

Il sequenziamento di migliaia di geni ha consentito di comprendere come il **microbiota sia caratterizzato da una straordinaria plasticità**, grazie a cui **questo ecosistema è in grado di modificarsi molto rapidamente in risposta a una serie di stimoli estrinseci come fattori ambientali** (microrganismi differenti in aree geografiche, alterazioni climatiche e uso di farmaci) **e dieta, e fattori intrinseci come la genetica, la fisiologia e l'età dell'ospite, o il microambiente intestinale** (presenza di stati flogistici e di malattia).

Va sottolineato che ogni individuo ha una sua "impronta digitale" batterica, cioè un profilo di specie suo proprio, diverso da quello di altri individui, ma anche un "core" di specie comuni a tutti gli individui.

**La composizione del microbiota si modifica in rapporto all'età dell'ospite.** Dalla nascita alla vecchiaia si osservano dei cambiamenti nei phyla e nei generi che accompagnano le diverse fasi della vita. Alla nascita si considera che l'intestino umano sia sterile, anche se i dati più recenti suggeriscono una colonizzazione batterica intestinale in utero attraverso l'ingestione da parte del feto di batteri contenuti nel liquido amniotico. L'analisi di campioni di meconio da bambini nati per via naturale ha evidenziato che il microbiota intestinale riflette già il microbiota vaginale materno: si ipotizza che il microbiota venga trasmesso in modo verticale dalla madre al figlio e in un

secondo tempo si differenzi nei diversi distretti anatomici. La modalità del parto modifica il microbiota del neonato: mentre il parto naturale promuove lo sviluppo di un microbiota più simile a quello vaginale materno, con prevalenza di Lattobacilli, il parto per via chirurgica induce un microbiota prevalentemente composto da microrganismi presenti a livello della cute della madre, presenti anche nell'ambiente chirurgico e si caratterizza per la presenza di stafilococchi, corinebatteri e propionibatteri, causa di una maggiore suscettibilità a patogeni responsabili di eventi infettivi (Putignani et al., 2014).

L'uso di antibiotici da parte della madre prima e durante il parto con taglio cesareo impatta sull'ecosistema microbico del nascituro con un aumento del rapporto relativo tra Gram positivi e Gram negativi. Altri momenti cruciali per la colonizzazione del tratto gastrointestinale sono l'allattamento e lo svezzamento.

**Il tipo di alimentazione nelle prime settimane di vita modifica la composizione del microbiota intestinale.** Nei bambini allattati al seno, si osserva la colonizzazione del tratto digerente da parte principalmente di *Actinobacteria*, in particolar modo Bifidobatteri, e di *Firmicutes*, come *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Clostridium* (Odamaki et al., 2016).

Nei bambini alimentati con latti in formula, il microbiota si compone prevalentemente di *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* e *Clostridi*, mentre sono ridotti i livelli di Bifidobatteri, importanti perché associati allo sviluppo e alla maturazione del sistema immunitario (Kashtanova et al., 2016; Rutayisire et al., 2016).

**Il passaggio all'alimentazione complementare e all'introduzione di cibi solidi verso il 6° mese di vita modifica ulteriormente la composizione del microbiota** con il progressivo aumento delle famiglie delle *Lachnospiraceae* e delle *Ruminococcaceae*. **Fra i 3 e i 4 anni di età si osserva un incremento dei Firmicutes e dei Bacteroidetes.** Nella vita adulta si osserva una riduzione della abbondanza relativa di *Bacteroidetes* e, per contro, nell'età anziana, specialmente nelle classi di età più avanzate, si verifica una diminuzione di *Firmicutes* con marcato sbilanciamento verso i *Bacteroidetes* (Odamaki et al., 2016; Claesson et al., 2012) (Fig. 2).

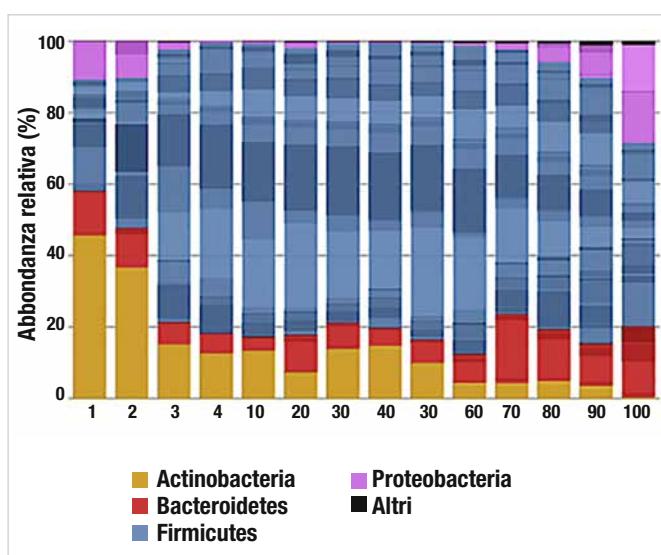
### Dieta e microbiota

**Le modificazioni della dieta rappresentano uno dei fattori più rilevanti ai fini della modifica della composizione del microbiota:** è stato osservato che cambiamenti dello stile alimentare inducono alterazioni di alcuni gruppi microbici nel giro di qualche ora, a testimonianza del grado di dinamicità e della variabilità interindividuale del microbiota stesso (David et al., 2014).

A seconda del tipo di alimentazione alcuni gruppi microbici sono capaci di crescere più rapidamente di altri, aumentando la loro abbondanza relativa.

Per inquadrare meglio questo importante aspetto bisogna ricordare che **i principali gruppi microbici intestinali ricavano energia dalla fermentazione di carboidrati (metabolismo saccarolitico) o dalla degradazione di proteine (metabolismo proteolitico o putrefattivo)**.

A causa dell'assorbimento nei tenue, il colon è un ambiente povero di zuccheri semplici quali mono- e disaccaridi. Sono invece presenti oligo- e polisaccaridi che resistono all'idrolisi



**Figura 2.**

Abbondanza relativa dei phyla nelle diverse fasi della vita di un uomo (da Odamaki et al., 2016, mod.).

da parte delle idrolasi dell'ospite, quali amido, inulina, frutto-oligosaccaridi (FOS), oligosaccaridi della soia (raffinosio e stachiosio), polidestrosio, pectine, gomme, mucine e alcune emicellulose.

**La fermentazione saccarolitica a opera soprattutto di alcuni gruppi batterici (come *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Prevotella*) produce come metaboliti principali gli SCFA, come acetato, propionato e butirrato, il lattato e alcuni gas (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>)** (Macfarlane et al., 2012).

La fermentazione dei carboidrati è fondamentale per la micro-ecologia e la fisiologia del colon.

Circa il 95% degli SCFA prodotti dalla microflora intestinale viene rapidamente assorbito dai colonociti. Gli SCFA, dopo essere stati assorbiti, vengono metabolizzati:

- dalle cellule dell'epitelio del cieco e del colon che utilizzano il butirrato come principale fonte di energia;
- dagli epatociti che metabolizzano parte del butirrato e il propionato per la gluconeogenesi e che assorbono parte dell'acetato;
- dalle cellule muscolari che traggono energia dall'ossidazione dell'acetato residuo.

L'assorbimento degli SCFA apporta approssimativamente il 5-10% della necessità energetica complessiva dell'organismo.

**Gli SCFA hanno diverse proprietà bioattive.**

Il butirrato regola il trasporto transepiteliale di fluidi, migliora lo stato ossidativo e di infiammazione mucosa, rinforza l'integrità della barriera mucosa, attraverso l'incremento della produzione di muco e dell'espressione delle giunzioni serrate (*Tight Junction*, TJ) tra le cellule epiteliali. Questo acido grasso libera i peptidi che generano la sazietà, *glucagon-like-1* (GLP-1) e YY (PYY), dalle cellule endocrine intestinali-L, agendo almeno in parte come agonista dei recettori 2 e 3 degli acidi grassi e partecipando così all'omeostasi del glucosio, sia nell'animale sia nell'uomo (Aureli, 2011).

**Gli SCFA inducono una riduzione del pH intestinale che influenza la composizione della microflora intestinale, riduce lo sviluppo di clostridi patogeni e di batteri proteolitici e putrefattivi;** inoltre l'acidificazione dell'ambiente intestinale favorisce l'assorbimento dei minerali, riduce l'assorbimento dell'ammoniaca e delle amine trasformandole nelle corrispondenti forme protonate molto meno diffusibili.

**Gli SCFA agiscono sull'omeostasi del sistema immunitario con meccanismi di regolazione sulla differenziazione delle cellule T regolatorie (Treg) e sulla produzione di interleuchine antinfiammatorie, ed esercitano una attività sul sistema nervoso centrale (SNC)** (Nastasi et al., 2015).

Lungo il transito nel grosso intestino, la concentrazione dei carboidrati fermentabili si riduce gradualmente fino all'esaurimento, facendo sì che il metabolismo fermentativo ceda il passo a quello proteolitico putrefattivo, come evidenziato dal progressivo aumento del pH.

**Le proteasi prodotte dai gruppi microbici proteolitici idrolizzano le proteine ad aminoacidi e peptidi semplici,** che rappresentano un'importante fonte di azoto per l'intero microbiota. La fermentazione delle proteine porta alla formazione di numerosi metaboliti potenzialmente tossici quali:

- composti fenolici: indolo, p-cresolo e scatolo;
- amine;
- ammoniaca;
- idrogeno solforato.

Questi **metaboliti derivanti dal metabolismo proteolitico sono stati associati a diverse patologie** (v. capitolo sulla funzionalità renale).

**Il microbiota interviene in modo determinante anche nel metabolismo degli acidi biliari** che vengono deconjugati in acidi biliari secondari (Macfarlane et al., 2012).

La più importante biotrasformazione degli acidi biliari primari a carico del microbiota intestinale è la 7  $\alpha$ -deidrossilazione, con formazione degli acidi secondari litocolico e desossicolico. Elevati valori di acido desossicolico nel siero, nella bile e nelle feci sono stati associati a un aumentato rischio di calcoli biliari e di tumore al colon. Inoltre gli acidi biliari secondari sono considerati implicati in circuiti metabolici legati all'obesità e al diabete di tipo 2.

L'acidificazione del colon derivante da un forte metabolismo saccarolitico diminuisce la solubilità degli acidi biliari, ne limita il riassorbimento e ne favorisce l'escrezione con le feci.

È stato osservato che **una dieta ricca di fibre consente lo sviluppo di batteri come *Bacteroides* e *Clostridium cluster IV e XIVa*, non patogeni e saccarolitici, che da una parte degradano gli oligo-polisaccaridi contenuti nelle fibre non digeribili diversamente dall'ospite e dall'altra producono SCFA** (David et al., 2014).

Va al proposito sottolineato che nel nostro genoma sono presenti solo 17 enzimi coinvolti nella degradazione di zuccheri semplici, mentre il microbiota fornisce all'ospite un arsenale di migliaia di enzimi, che prende il nome di glicobioma, capaci, in una catena sintrofica, di degradare gli oligo- o polisaccaridi non degradabili altrimenti dagli enzimi costitutivi dell'ospite (El Kaoutari et al., 2013). Microbiota e ospite possono così entrambi sfruttare la degradazione degli zuccheri complessi.

**Una dieta ricca in proteine determina, per contro, la crescita di batteri proteolitici;** alcuni di questi fanno parte dei Clostridi e altri dei *Bacteroides*: quindi dal punto di vista tassonomico gli stessi phyla hanno generi differenti (saccarolitici o proteolitici). **I batteri proteolitici sono in grado di metabolizzare proteine e aminoacidi aromatici e alifatici arrivando a prodotti finali della fermentazione rappresentati prevalentemente da metaboliti** (fenoli, indoli e metilamine) **che giocano un'attività importante in senso pro-infiammatorio** e hanno un ruolo ben codificato nella steatosi epatica, nell'obesità e nel diabete.

**Una dieta ricca in grassi consente la selezione di alcuni gruppi microbici solfato-riduttori capaci di metabolizzare gli acidi biliari** che, come prima ricordato, vengono deconjugati in acidi biliari secondari. Il prodotto metabolico finale è rappresentato da idrogeno solforato (H<sub>2</sub>S) che ha un **effetto tossico sull'epitelio intestinale aumentando la permeabilità intestinale e quindi favorendo l'endossemia metabolica cioè il passaggio di lipopolisaccaridi (LPS) batterici in circolo a effetto pro-infiammatorio.**

Nella transizione da una dieta ricca in carboidrati e con pochi

grassi a un'altra ipocalorica ricca in carboidrati e in grassi, la popolazione microbica intestinale cambia dal cluster dei *Bacteroidetes* a quello dei *Firmicutes*. L'aumento dei *Firmicutes* è una risposta selettiva del microbiota per permettere lo smaltimento rapido ed efficiente dell'abbondanza di sostanze nutrienti.

L'aumento di batteri opportunisti pro-infiammatori, dotati di una più elevata capacità metabolica adatta alla dieta Western-style, si accompagna a una riduzione significativa della diversità microbica, produzione di acidi biliari, liberazione di LPS, infiammazione intestinale, permeabilità della barriera intestinale (Tilg et al., 2009). Una dieta vegetariana esplica un effetto opposto: **le fibre nutrono i batteri simbiotici (ad es. *Bacteroidetes* e *Prevotella*) capaci di determinare produzione di SCFA ad azione anti-infiammatoria, di promuovere una alta biodiversità microbica e di partecipare alla protezione della barriera intestinale.**

**Una dieta ricca in proteine e grassi animali e povera in carboidrati derivati dalle fibre altera, quindi, il microbiota, favorendo un profilo microbico potenzialmente patogeno e pro-infiammatorio**, una diminuita produzione di SCFA e una aumentata concentrazione di ammoniaca, fenoli e idrogeno solforato. Questi metaboliti compromettono largamente la struttura dell'epitelio intestinale, causando infiammazione della mucosa, ma possono anche interferire sulla modulazione del sistema nervoso enterico e della motilità intestinale.

### Dialogo con il sistema immunitario (programming, tolleranza, regolazione)

#### Il microbiota gioca un ruolo essenziale nello sviluppo e nella maturazione del sistema immunitario.

È utile ricordare che il sistema immunitario è un sistema complesso che origina negli organi linfoidi centrali e secondari. Gli organi linfoidi centrali sono deputati alla produzione delle cellule immunitarie mentre negli organi secondari periferici, milza, linfonodi, tonsille, placche di Peyer e GALT (*Gut Associated Lymphatic Tissue*) cioè il sistema immunitario associato alla barriera mucosale intestinale, avviene la presentazione degli antigeni alle cellule del sistema di difesa.

La risposta immunitaria, una volta che un microrganismo invade le barriere fisiche, si esplica dapprima attraverso una risposta innata, con fagociti, cellule dendritiche, attivazione del sistema del complemento e linfociti innati (ILC) e successivamente mediante una risposta adattativa con intervento di cellule come i linfociti T o B che mediano una risposta altamente specifica con memoria, neutralizzando l'agente riconosciuto come non self.

La risposta adattativa viene interrotta dalle cellule regolatrici T e B (Treg e Breg) che inducono una *down-regulation* dei linfociti T e B, ristabilendo un equilibrio immunitario.

Addentrando più a fondo nel GALT, va ricordato che la barriera mucosale è composta, oltre che dalle cellule epiteliali intestinali, anche dalle cellule M adibite al trasporto dei microrganismi all'interno della lamina propria per essere presentati al sistema immunitario, dalle cellule di Paneth produttrici di sostanze antimicrobiche e dalle cellule globose (*Globet Cells*), produttrici di muco. La funzione della barriera è aiutata dal-

le cellule del sistema immunitario in questa sede che sono rappresentate da linfociti innati (ILC), cellule dendritiche (DC), linfociti intraepiteliali (CD8+), linfociti T e B e plasmacellule IgA produttrici.

**I prodotti microbici** (i cosiddetti pattern molecolari associati ai microbi o MAMPs) come polisaccaride A, LPS e flagelline o *Microbial Anti-Inflammatory Molecule* (MMA) sono gli elementi che **fanno "dialogare" i microrganismi con il sistema immunitario**: si tratta di prodotti del metabolismo batterico o molecole superficiali che interagiscono con recettori rappresentati dai *Pattern Recognition Receptors* (PRR) come i *Toll Like Receptor* (TLR) presenti sia sulle cellule epiteliali intestinali sia sulle cellule dendritiche. L'avvenuto riconoscimento attiva le vie interne molecolari dei TLR che avviano la produzione di citochine in senso infiammatorio o antinfiammatorio (Abbas et al., 2015).

La colonizzazione intestinale dopo la nascita stimola la maturazione del GALT con attivazione delle cellule T e B, già presenti in età fetale ma in stato immaturo, attivazione dei centri germinativi dei linfonodi e delle placche del Peyer e delle cellule globet e di Paneth. In questa cascata di eventi si attiva anche la produzione di IgA specifiche verso il microbiota, senza tuttavia induzione di infiammazione.

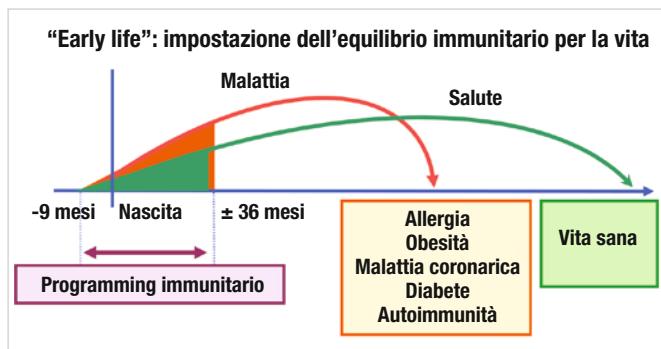
L'influenza del microbiota su sviluppo e maturazione del sistema immunitario è documentato da una nutrita mole di studi su modello animale e su uomo.

Animali *germ-free* (GF) hanno una minore densità di cellule linfoidi nella mucosa intestinale e un inferiore livello di immunoglobuline nel siero (Martin et al., 2010). L'esposizione a microbi commensali espande rapidamente il numero di linfociti nelle mucose e incrementa le dimensioni dei centri germinativi nei linfonodi, mentre contemporaneamente nella lamina propria appaiono cellule produttrici di immunoglobuline e si ha un significativo incremento di immunoglobuline nel siero.

Esistono numerose evidenze in letteratura secondo cui neonati che sviluppano malattie allergiche nel corso della vita hanno nelle prime fasi di vita un pattern microbico alterato nel loro microbiota. È stato osservato che neonati dati alla luce con parto chirurgico oltre ad avere, come prima ricordato, una composizione diversa del microbiota rispetto a quelli nati per via naturale, presentano una produzione più elevata di IL-13 che è stata associata a una più elevata incidenza e a una maggiore severità di asma e atopia sviluppate negli anni. Inoltre, è stato osservato come l'assunzione di probiotici da parte della madre sia in grado di influenzare il microbiota intestinale del bambino e ridurre il rischio di eczema (Martin et al., 2010; Amarasekera et al., 2013). Tutte queste evidenze sottolineano **l'importanza di un microbiota in equilibrio con l'ospite ai fini di un programming immunitario in grado di promuovere uno stato di salute in età adulta** (Fig. 3) (Kerperien et al., 2012).

#### La tolleranza immunitaria

**Il dialogo tra microbiota e sistema immunitario è volto al raggiungimento di un equilibrio, di una omeostasi.** Il microbiota attiva meccanismi di tolleranza immunologica attraverso: i) un'attivazione di cellule Treg indotta dalla produzione da parte delle DC di IL10 e TGF- $\beta$ ; ii) la stimolazione



**Figura 3.**

Un programming immunitario corretto nelle prime fasi della vita è considerato come un fattore prognostico favorevole allo sviluppo di uno stato di salute in età adulta (da Kerperien et al., 2012, mod.).

dei ILC a produrre IL-22 implicata nella riparazione dei danni della barriera intestinale; iii) attivazione della trascrizione dei geni che codificano per la mucina; iv) stimolazione delle plasmacellule alla produzione di IgA specifiche per il microbiota (Brown et al., 2013).

Il sistema immunitario controlla dunque il microbiota e vigila contro potenziali minacce dai microrganismi patogeni. D'altra parte, il microbiota intestinale può interagire con il sistema immunitario influenzando meccanismi epigenetici dell'ospite. Gli SCFA prodotti dai batteri commensali per esempio sono stati visti essere in grado di influenzare l'attività enzimatica implicata in modificazioni post-traslazionali delle proteine istoriche e dell'espressione genica, a ulteriore riprova delle complesse interazioni tra microbiota e sistema immunitario.

#### Key point

- Il corpo dell'uomo è colonizzato da una serie di ecosistemi, con una specificità di nicchia, che prende il nome di microbiota, cioè un insieme di microrganismi, batteri, virus, funghi che convivono pacificamente e in modo simbiotico con l'ospite.
- I batteri intestinali permettono all'ospite di utilizzare diverse fonti energetiche, sono in grado di influenzare l'assorbimento di ioni, sono coinvolti nella conversione di componenti polifenolici, sintetizzano vitamine (per esempio vitamina K e vitamine del complesso B), SCFA come acetato, butirrato e propionato e producono sostanze antimicrobiche.
- Le modificazioni della dieta rappresentano uno dei fattori più rilevanti ai fini della modifica della composizione del microbiota.
- I principali gruppi micobici intestinali ricavano energia dalla fermentazione di carboidrati (metabolismo saccarolitico) o dalla degradazione di proteine (metabolismo proteolitico o putrefattivo).
- La fermentazione saccarolitica produce come metaboliti principali gli SCFA, come acetato, propionato e butirrato che agiscono sull'omeostasi del sistema immunitario con meccanismi di regolazione sulla differenziazione delle cellule T regolatorie (Treg) e sulla produzione di interleuchine

antinfiammatorie, ed esercitano un effetto di regolazione dell'alvo.

- I metaboliti derivanti dal metabolismo proteolitico giocano un'attività importante in senso pro-infiammatorio e sono stati associati a diverse patologie.
- Il microbiota gioca un ruolo essenziale nello sviluppo e nella maturazione del sistema immunitario e il dialogo tra microbiota e sistema immunitario è volto al raggiungimento di un equilibrio.

## 2. Microbiota e funzione di barriera

### Importanza della barriera intestinale come direttore d'orchestra dei vari sistemi

La mucosa intestinale rappresenta la più grande superficie del nostro organismo, raggiungendo quella di un campo da tennis, cioè circa 250 m<sup>2</sup>; è un importante organo di difesa, disposta come una barriera nei confronti degli antigeni e dei patogeni (Aureli et al., 2011). L'arma di difesa principale di tale barriera, il tessuto linfatico associato (MALT), è un elemento importante della capacità immunologica complessiva dell'ospite.

**La barriera intestinale ha accanto alla funzione di difesa quella non meno importante di superficie di assorbimento e permeabilità di nutrienti, acqua ed elettroliti. Questa funzionalità** dicotomica discriminante, di esclusione di agenti o sostanze dannose provenienti dal lume intestinale e di permeabilità a sostanze necessarie all'organismo, è regolata da fini processi **in cui il ruolo del microbiota è sostanziale**.

La regolazione degli scambi di molecole tra l'ambiente e l'ospite attraverso la barriera intestinale influenza l'equilibrio tra la tolleranza e la risposta immunitaria verso antigeni riconosciuti come self o non-self. Queste funzioni sono preservate dalle componenti strutturali della barriera intestinale costituita da tre strati distinti:

- pre-epiteliale, formato dal glicocalice, che produce un sottile strato di muco che contiene IgA e peptidi antimicrobici e ricopre l'epitelio ostacolando l'accesso alle cellule stesse da parte dei batteri;
- epiteliale, formato da un singolo strato di cellule epiteliali (IEC) interconnesse tra loro da un articolato complesso giunzionale;
- post-epiteliale, costituito dalla membrana basale (tessuto connettivo, che mantiene in sede l'epitelio) e dalla muscolare mucosae (muscolo liscio).

Il muco è strutturato in un doppio strato, uno esterno e l'altro interno, ed è rappresentato da un gel composto da polimeri di mucina che formano lunghe catene peptidiche glicosilate. Tali proteine sono prodotte dalle cellule globose (*Goblet Cells*) che rinnovano lo strato mucoso interno approssimativamente ogni ora (Kelly et al., 2015). Questi processi dinamici sono soggetti a un continuo interplay con il microbiota intestinale, le cui alterazioni possono avere importanti implicazioni per le funzioni chiave di barriera.

In condizioni normali con lo strato epiteliale intatto, le IEC sono connesse da due principali tipi di giunzioni intercellulari, le

giunzioni serrate (TJ) e le giunzioni aderenti (*Adherens Junctions*, AJ), che controllano la permeabilità paracellulare attraverso gli spazi intercellulari. Nella barriera epiteliale, le TJ e le AJ sono ben definite e distribuite: le TJ costituiscono la parte apicale, mentre le AJ sono localizzate nella parte basolaterale al di sotto delle TJ. Entrambe sono connesse al citoscheletro di actina.

Le TJ sigillano lo spazio paracellulare e sono dei complessi multi-proteici costituiti da proteine integrali di membrana (claudine, occludine e molecole di adesione giunzionale), proteine periferiche di membrana (*Zonula Occludens*, ZO) e molecole regolatrici come le chinasi.

Le ZO sono cruciali per l'assemblaggio e il mantenimento delle TJ poiché possiedono domini multipli per l'interazione con altre proteine, incluse le proteine integrali di membrana e l'actina.

Il riconoscimento dei batteri commensali da parte delle cellule epiteliali intestinali scatena la produzione di diverse molecole immunoregolatorie, per esempio la lipoproteina timica stromale (TSLP) e il fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ) (Rimoldi et al., 2005; Zeuthen et al., 2008). Questi segnali, uno alla volta, promuovono lo sviluppo delle cellule immunitarie mucosali con proprietà tolerogeniche. Questo cross-talk tra batteri commensali, IEC e cellule immunitarie è importante per il mantenimento dell'omeostasi e il contenimento dell'infiammazione incontrollata nel tratto gastro-intestinale (Peterson et al., 2014).

**In presenza di alterazioni della composizione del microbiota con sbilanciamento verso forme batteriche meno favorevoli o eccesso di batteri patogeni viene evocata una risposta pro-infiammatoria** Th1-Th17 che determina l'attivazione del fattore nucleare kappa B (NF- $\kappa$ B) con liberazione di citochine infiammatorie (Peterson et al., 2014). **Queste citochine possono danneggiare le proteine che regolano la coesione cellulare dell'epitelio intestinale** come zonulina e occludina e implementare la permeabilità intestinale. **L'aumento della permeabilità intestinale, definita secondo la terminologia anglosassone "leaky gut", determina il passaggio di batteri e prodotti di derivazione batterica come il lipopolisaccaride (LPS) a livello sistematico, determinando uno stato di endotossinemia metabolica e di infiammazione.**

L'integrità funzionale della barriera intestinale dell'organismo, secondaria a una situazione di equilibrio tra microbiota e sistema immunitario, risulta indispensabile per la salute dei diversi organi e apparati (McFall-Ngai et al., 2013) (Fig. 4). **Il metabolismo del microbiota è un elemento cruciale al mantenimento dell'integrità della barriera intestinale e quindi a una condizione di salute dell'ospite e di omeostasi.** Un esempio è dato dal butirrato, uno dei principali prodotti finali della fermentazione delle fibre alimentari da parte dei batteri intestinali, che rappresenta la maggiore fonte di energia per le IEC, ma può esercitare direttamente effetti immunomodulatori e anti-infiammatori (Hamer et al., 2008). Il butirrato inibisce l'attività dell'istone deacetilasi e così sopprime l'attività proteasica attraverso la riduzione dei livelli di espressione di alcune subunità del proteasoma. Questo risulta nell'inibizione della degradazione proteasomale di I $\kappa$ B e conseguentemente

limita l'attivazione di Nf- $\kappa$ B (Place et al., 2005).

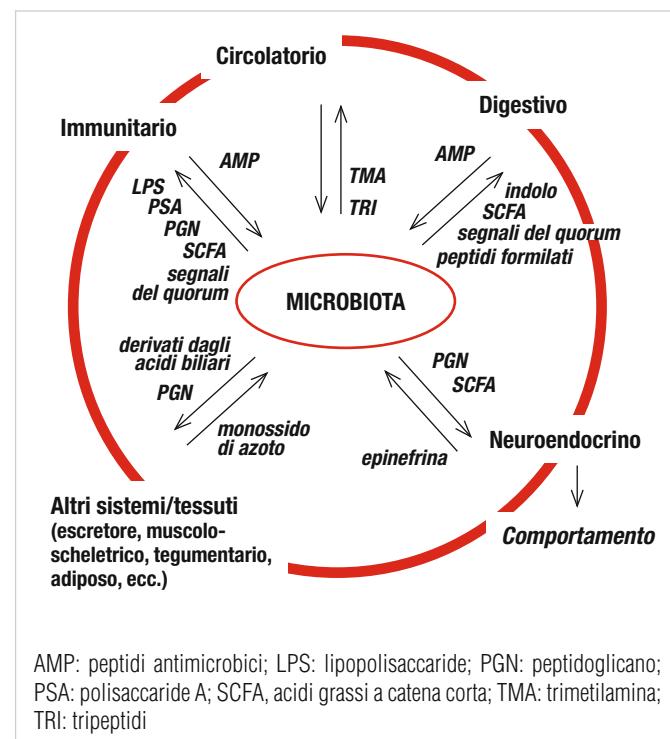
### Eubiosi e disbiosi

**La composizione del microbiota più vantaggiosa per l'ospite, definita eubiosi, è il risultato di un insieme di condizioni individuo-specifiche che promuovono la crescita di gruppi micobici il cui metabolismo interagisce positivamente con il sistema immunitario contribuendo a una funzionalità ottimale della barriera intestinale.**

La composizione e la densità dei batteri cambia lungo il tratto gastro-intestinale degli individui sani. A livello di quantità, il numero di batteri cresce da  $10^3$  a  $10^5$  batteri per millilitro nel contenuto luminale dello stomaco e del duodeno fino ad arrivare a  $10^9$  e  $10^{12}$  per millilitro nell'ileo e nel colon rispettivamente (Artis et al., 2008). Parlando invece in termini qualitativi, la diversità batterica aumenta dalla sede prossimale a quella distale del tratto gastro-intestinale. Lo stomaco è spesso colonizzato da specie di *Helicobacter* e meno da *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella* e *Rothia*, il quale è un genere all'interno della famiglia *Actinomycetaceae* (Hollister et al., 2014).

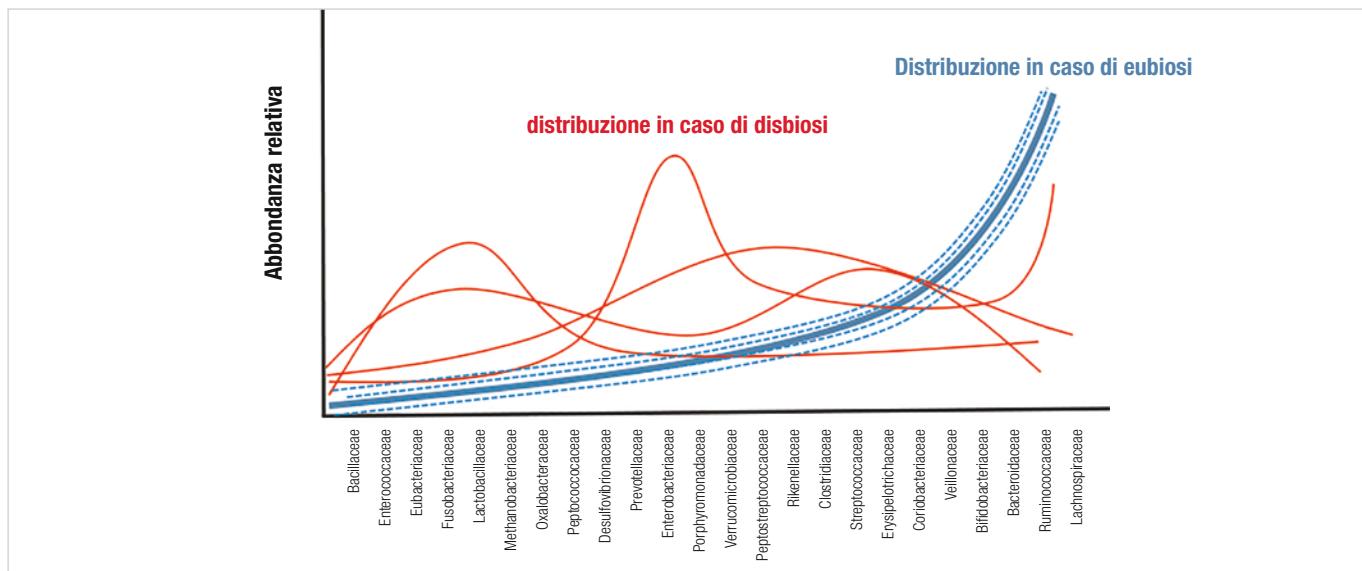
I generi *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e i membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* sono i maggiori componenti del microbiota nell'intestino tenue (Brown et al., 2013).

A livello del colon la composizione del microbiota è molto



**Figura 4.**

I segnali di origine metabolica tra microbiota e sistema immunitario mediati attraverso la barriera intestinale partecipano all'omeostasi dell'organismo. Alterazioni in questo equilibrio determinano stati patologici (da McFall-Ngai et al., 2013, mod.).

**Figura 5.**

Composizione del microbiota nella eubiosi e nella disbiosi (da Zaneveld et al., 2017, mod.).

diversa e quest'ultimo viene di solito considerato un'entità omogenea, che mostra, però, considerevoli variazioni tra gli individui.

In aggiunta alle differenze nella composizione del microbiota tra le parti prossimali e distali del tratto gastro-intestinale, composizioni microbiche distinte esistono nel lumen e nella mucosa (Eckburg et al., 2005). Però occorre precisare che le conoscenze riguardo al microbiota associato alla mucosa restano limitate perché richiedono metodi invasivi per il campionamento. (Ouwerkerk et al., 2013). Le analisi delle comunità microbiche dei differenti siti mucosali del colon (cieco, colon ascendente, colon trasversale, colon discendente, colon sigmoidale e retto) suggeriscono un pattern variegato ed eterogeneo nella distribuzione dei batteri mucosali lungo il corso del colon, che potrebbe indicare l'esistenza di nicchie microanatomiche. In generale, il microbiota mucosa-associato comprende un'alta abbondanza di *Firmicutes* rispetto ai *Bacteroidetes* (Eckburg et al., 2005).

Sebbene alcuni batteri degradanti la mucina aumentino di numero durante l'infiammazione, suggerendo un loro contributo nella patogenesi della malattia, essi sono anche parte del microbiota mucosa-associato nell'uomo sano (Png et al., 2010). Le specie descritte come specializzate nel degradare la mucina includono commensali predominanti come *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Akkermansia muciniphila*, entrambi associati a effetti protettivi in vivo e in vitro (Everard et al., 2013).

Dato che **ogni essere umano ha un microbiota specifico e diverso dagli altri esseri umani** la difficoltà è definire che cosa si intenda per microbiota eubiotico, e, al contrario, che cosa sia un microbiota disbiotico, ovvero una composizione microbica dannosa per l'ospite e come la disbiosi si correli alla patologia.

Un recente lavoro pubblicato su *Nature Microbiology* (Zane-

veld et al., 2017) fa il punto della situazione rifacendosi all'incipit del romanzo Anna Kerenina di Lev Tolstoj, in cui il romanziere russo ricorda che *“tutte le famiglie felici sono uguali mentre quelle infelici lo sono ognuna a modo suo”*. Questo principio se applicato al microbiota intestinale indica che tutti i microbioti eubiotici sono simili mentre per azioni di stressori (malattia, dieta, uso di antibiotici, stress, attività fisica ecc) si determina una dispersione stocastica che comporta una disbiosi, che, a differenza della eubiosi, è diversa da caso a caso, dipendendo dalle condizioni dell'individuo.

L'eubiosi è una condizione in cui può variare entro certi limiti l'abbondanza relativa dei diversi microrganismi in funzione della diversità interindividuale, della condizione dell'ospite e dell'età. Alcuni microrganismi sono fisiologicamente dominanti, con alta abbondanza relativa, altri sono subdominanti e infine altri sono a bassa abbondanza relativa. **In condizioni di disbiosi la distribuzione dei microrganismi è totalmente differente da caso a caso** (Fig. 5).

L'eubiosi è descritta da un numero discreto di configurazioni stabili del microbiota, mentre **la disbiosi ha una composizione instabile del microbiota che si modifica rapidamente nel tempo**. È quindi estremamente difficile studiare e caratterizzare la disbiosi (Halfvarson et al., 2017).

Alcuni tratti vengono tuttavia oggi riconosciuti dalla comunità scientifica come **comune denominatore della disbiosi**. Innanzitutto **la riduzione dei batteri produttori di SCFA, soprattutto di butirato**. Altro aspetto che caratterizza la disbiosi è **l'aumentato potenziale di degradazione del muco da parte di batteri degradatori della mucina** che spiazzano la *Akkermansia muciniphila*, microrganismo che normalmente, come prima ricordato, agisce degradando il muco ma in modo meno aggressivo.

Ulteriori elementi della disbiosi sono la ridotta produzione di

idrogeno e metano con **aumento di idrogeno solforato, tossico per l'epitelio, e l'aumento di abbondanza relativa di batteri proteolitici (Proteobatteri) a effetto pro-infiammatorio** mediato da endotossine LPS.

Non solo la disbiosi genera infiammazione, ma è vero anche il contrario: stati infiammatori determinano l'aumento di patobionti cioè microrganismi patogeni che in uno stato eubiotico sono presenti con una bassa abbondanza relativa utile a tenere sempre allertato il sistema immunitario. L'aumento della concentrazione di patobionti genera a sua volta infiammazione cronica innescando così un circolo vizioso che è difficile interrompere.

**Le alterazioni del microbiota sono state correlate a una nutrita serie di patologie come disordini legati alla nutrizione (obesità, diabete tipo 2, sindrome metabolica), malattie infiammatorie croniche intestinali (colite ulcerosa e malattia di Crohn), disturbi funzionali intestinali (sindrome intestino irritabile), complicazioni sistemiche di epatopatie scompensate, malattie cardiovascolari, atopia/allergia e cancro colo-rettale.**

### Implicazioni metaboliche

A monte di molti disordini metabolici cronici è documentato un ruolo chiave giocato dal microbiota intestinale.

#### Obesità

Le prime evidenze su quanto **i microrganismi presenti nell'apparato gastrointestinale possano essere importanti nello sviluppo di obesità** vengono da studi condotti su topi GF paragonati a topi convenzionalizzati. In condizioni basali i topi convenzionalizzati hanno un contenuto di grasso corporeo del 40% superiore rispetto a quelli GF (axenici), indipendentemente dal regime alimentare. Dopo colonizzazione dell'intestino dei topi axenici con microbiota proveniente da topi convenzionalizzati si sono osservati un significativo aumento ponderale, un aumento del 60% del grasso corporeo, un importante incremento della sintesi epatica di trigliceridi e lo sviluppo di insulino-resistenza, indipendentemente dalla dieta e dalla spesa energetica totale. L'aumento della massa grassa risulta ancora più evidente quando la comunità microbica intestinale deriva da topi geneticamente obesi (ob-ob) (Festi et al., 2014).

Per spiegare questi riscontri sono stati proposti vari meccanismi. Il primo è che la convenzionalizzazione del microbiota intestinale raddoppierebbe la densità di capillari a livello dell'epitelio dei villi del piccolo intestino, contribuendo a raddoppiare l'assorbimento intestinale dei monosaccaridi (Stappenbeck et al., 2002). Il secondo meccanismo è legato all'estrazione di energia dai componenti alimentari (polisaccaridi della fibra) non digeribili da parte degli enzimi umani, che vengono processati dagli enzimi batterici con produzione di monosaccaridi (successivamente assorbiti) e di SCFA, attraverso la fermentazione. Gli SCFA esercitano funzioni metaboliche complesse che incidono sull'appetito dell'ospite, sul tempo di transito intestinale, sull'assorbimento e sul deposito di lipidi (Festi, 2014). In aggiunta, gli SCFA partecipano alla lipogenesi epatica de novo attraverso l'espressione di alcuni enzimi chiave come acetil-CoA carbossilasi (ACC) e acido grasso sintasi (FAS). Sia ACC che FAS sono controllati da due fattori nuclea-

ri: la proteina legante l'elemento responsivo ai carboidrati (ChREBP) e la proteina legante l'elemento responsivo agli steroli (SREBP-1) (Denechaud et al., 2008). La convenzionalizzazione di topi axenici promuove l'espressione epatica di mRNA per ChREBP e SREBP-1 inducendo la lipogenesi epatica de novo (Backhed, et al., 2004).

Inoltre il microbiota intestinale regola il deposito di grasso anche attraverso un meccanismo che collega i trigliceridi circolanti alla soppressione dell'espressione intestinale di un inibitore della lipoprotein-lipasi (LPL), il FIAF, fattore adiposo indotto dal digiuno. Il FIAF normalmente inibisce l'attività della LPL, riducendo in tal modo il rilascio degli acidi grassi dai trigliceridi circolanti. Dopo la colonizzazione intestinale con microbiota, l'espressione del FIAF si riduce, con conseguente maggiore attività della LPL e maggiore deposito di grasso (Backhed et al., 2004). In accordo con questa ipotesi, topi carenti in FIAF sono resistenti all'aumento di peso.

La complessità della composizione batterica intestinale è stata studiata per individuare eventuali specie specifiche in rapporto al differente stato di nutrizione. A questo proposito, Ley et al., hanno dimostrato che topi obesi presentano un forte sbilanciamento del rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* a favore dei *Firmicutes* (aumento del 50%) nel microbiota del cieco rispetto a quello di topi magri (Ley et al., 2005).

Un eccesso di grasso nella dieta aumenterebbe la proporzione di specie Gram-negative nel microbiota contribuendo così allo sviluppo di endotossiemia metabolica per aumento dei livelli plasmatici di LPS. Il LPS può influenzare sia il metabolismo che il sistema immunitario, fornendo quindi la base all'ipotesi che **il microbiota rappresenta una connessione funzionale tra vie metaboliche, immunità e infiammazione** (Olefsky et al., 2010). Una serie di esperimenti ha dimostrato che i batteri intestinali possono avviare i processi infiammatori associati a obesità e resistenza all'insulina modulando i livelli plasmatici di LPS.

La dieta ricca di grassi aumenta di 2-3 volte i livelli plasmatici di LPS (endotossiemia metabolica) e induce marcata riduzione di *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Eubacterium rectale* e *Clostridium coccoides*. Uno studio su topi privi del co-recettore CD14 del *Toll-Like Receptor-4* (TLR 4) sottoposti a quattro settimane di dieta ad alto tenore di grassi ha mostrato che questi non aumentano di peso, né sviluppano resistenza all'insulina al contrario di quanto succede in topi normali (Cani et al., 2007).

L'infusione cronica sottocutanea di LPS, che imita l'endotossiemia metabolica, induce infiammazione e resistenza insulinea e aumenta la massa sottocutanea e viscerale di circa il 30 e 40%, rispettivamente (Cani et al., 2007; Davis et al., 2008). La relazione tra una dieta ricca di grassi, l'obesità, il diabete tipo 2 e LPS è stata confermata anche nell'uomo. In soggetti sani, un pasto ricco di grassi induce un'endotossiemia metabolica con LPS che aumenta fino a concentrazioni sufficienti per indurre infiammazione (Amar et al., 2008; Laugeron et al., 2011).

Inoltre, diversi studi hanno proposto che gli acidi grassi saturi possono promuovere infiammazione di basso grado e insulino-resistenza attraverso un meccanismo TLR-4 dipendente (Suganami et al 2007).

Nel loro insieme, questi esperimenti suggeriscono che una cascata di segnali attivati da un meccanismo LPS/TLR-4/CD14 dipendente, a sua volta attiva l'espressione di TLR-2 per innescare la risposta infiammatoria del sistema immunitario innato. È stato ipotizzato che lo stato di infiammazione di basso grado presente nell'obesità possa essere influenzato dalla variazione del controllo sulla barriera intestinale, derivante dall'interazione tra microbiota e ospite (De La Serre et al., 2010).

In condizioni fisiologiche, l'epitelio intestinale agisce come una barriera efficace e continua che impedisce la traslocazione batterica. Tuttavia, varie situazioni esogene e/o endogene sono associate ad alterazione della funzione protettiva.

Vari meccanismi sembrano collegare i cambiamenti del microbioma intestinale nell'obesità con variazioni della funzione della barriera intestinale. La disbiosi contribuisce a un'alterata differenziazione delle cellule T con squilibrio tra T-helper e T-reg che porta a una disregolazione della tolleranza immunitaria (Festi, 2014).

L'utilizzo di prebiotici che modificano la flora batterica intestinale di topi geneticamente obesi è associata a un miglioramento significativo della permeabilità intestinale misurata in vivo, per aumentata espressione dell'mRNA delle proteine delle giunzioni strette.

Una barriera intestinale integra è stata correlata a ridotti livelli plasmatici portali di LPS e a diminuzione di citochine epatiche e circolanti (Cani et al., 2009). Inoltre la riduzione dell'infiammazione sistemica è correlata in modo significativo a una riduzione marcata dello stress ossidativo e infiammatorio nel tessuto epatico. Questi dati hanno fortemente suggerito che la modulazione della popolazione microbica intestinale nei topi obesi possa agire favorevolmente a migliorare la barriera intestinale. È stato evidenziato che una ridotta biodiversità del microbiota intestinale con espressione preferenziale di un minor numero di vie metaboliche, si correla ad adiposità, insulino-resistenza e a un più pronunciato fenotipo infiammatorio (Festi 2014).

#### Una sostanziale differenza nella composizione del microbiota intestinale di individui obesi rispetto ai magri è stata messa in evidenza da numerosi autori.

Alcuni studi hanno osservato una riduzione della proporzione dei Bacteroidetes negli obesi rispetto ai soggetti magri e agli anoressici (Million et al., 2011). Dall'analisi del 16S-rRNA di 154 individui obesi è emersa una riduzione della variabilità delle specie presenti nel microbiota intestinale, con riduzione dei *Bacteroidetes* e aumento invece di *Bifidobacterium* spp. del phylum *Actinobacteria* (Savage et al., 2007).

**Negli obesi rispetto a individui normopeso, è stata evidenziata una riduzione dei *Bacteroidetes* e di *Clostridium* spp. dei *Firmicutes*, e un aumento degli Enterococci dei *Firmicutes* stessi** (Zuo et al., 2011).

Il monitoraggio dei due principali phyla di batteri del microbiota intestinale, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* in obesi tenuti a dieta ipocalorica, evidenzia una bassa concentrazione di *Bacteroidetes*, che aumentano progressivamente mano a mano che il paziente perde peso, indipendentemente dall'introito energetico; viceversa i *Firmicutes*, che risultano in proporzione au-

mentati, si riducono quando il paziente viene messo a regime dietetico dimagrante (Kuo et al., 2007).

Altri studi sulla variazione del microbiota in seguito a trattamento dietetico ed esercizio fisico, eseguiti con la tecnica *Fluorescent in situ ibridization* (FISH), mostrano un aumento nella proporzione di *Bacteroidetes* e *Prevotella coccoides* e una riduzione di *Firmicutes* (*Clostridium hystolyticum*, *Eubacterium rectale* e *Clostridium coccoides*); tale riduzione correla con l'entità del calo ponderale (Nadal et al., 2009).

Inoltre è stato osservato che nei soggetti obesi o in sovrappeso vi è una aumentata presenza di batteri metano produttori (Archaea metanogenici, a cui appartiene il *Methanobrevibacter smithii*) che trasformano l'idrogeno in metano incrementando la resa energetica. Attualmente questi batteri sono considerati dei potenti produttori di calorie (Basseri et al., 2012; Mathur et al., 2013).

Infine, nel microbiota di soggetti obesi si è osservata la riduzione di batteri anti-infiammatori come *Akkermansia muciniphila* e un incremento di patobionti come *Campylobacter* e *Shigella*. Queste modificazioni comportano una riduzione della produzione di butirrato, un'aumentata degradazione di muco e un maggior stress ossidativo (Festi et al., 2014).

**Riassumendo, le principali caratteristiche del microbiota di soggetti in sovrappeso sono la ridotta diversità microbica, la diminuzione delle specie con proprietà antinfiammatorie e l'aumento di specie patogene. La disbiosi promuove un'alterazione nel dialogo con il sistema immunitario, un danno alla barriera intestinale con traslocazione batterica e sviluppo di endotossiemia metabolica correlata con lo sviluppo di un fenotipo obeso e con insulino-resistenza.**

#### Diabete

**L'endotossiemia metabolica è il primo passo per lo sviluppo di insulino-resistenza e diabete.** Infusioni sperimentali di LPS hanno condotto ad aumentate iperglicemia e iperinsulinenia. Inoltre, topi con mutazione di CD14/TLR4 resistenti a LPS si sono dimostrati resistenti a disordini metabolici indotti da diete a elevato contenuto di grassi, per riduzione della cascatta infiammatoria a livello epatico e del tessuto adiposo (Festi et al., 2014). A riprova del ruolo del microbiota nell'alterazione del metabolismo glucidico dell'ospite, è stato documentato come il trattamento antibiotico riduca l'endotossiemia metabolica e il contenuto cecale, sia in topi nutriti con diete ad alto tenore lipidico sia in quelli geneticamente obesi (ob/ob), con conseguente riduzione di infiammazione e miglioramento di insulino-sensibilità (Cani et al., 2008).

**La composizione del microbiota è un elemento cruciale ai fini della promozione di un dismetabolismo glucidico. In presenza di batteri produttori di butirrato o acido linolenico coniugato, come Bifidobatteri e Lattobacilli, si osserva un miglioramento della tolleranza al glucosio associato a una riduzione dell'endotossiemia, di citochine pro-infiammatorie circolanti e della permeabilità intestinale** (Festi et al., 2014).

È stato rilevato che l'abbondanza di *Akkermansia muciniphila*, batterio muco-degradatore, non solo è inversamente correlata al peso corporeo sia nei roditori sia negli uomini, ma anche

negativamente associata a diabete tipo 1 e 2. La normalizzazione della presenza di questo batterio mediante somministrazione di prebiotici si correla a un miglioramento del profilo metabolico e della sensibilità all'insulina (Festi, 2014).

#### Il microbiota intestinale quindi promuove lo sviluppo di insulino-resistenza e diabete tramite induzione di endotoxina metabolica LPS-associata.

Studi su uomo hanno documentato la presenza di livelli di LPS significativamente aumentati nei soggetti diabetici rispetto a controlli sani. Analisi di pirosequenziamento, condotte in soggetti nelle fasi precoci di ridotta tolleranza al glucosio, hanno permesso di identificare un "core" di microbiota composto prevalentemente (85-90%) dal phylum *Proteobacteria*, che potrebbe rappresentare un potenziale biomarker predittivo di sviluppo di diabete (Festi, 2014).

Comparando il metagenoma microbico di soggetti diabetici con quello di soggetti sani, Qin et al. hanno riscontrato solo nei soggetti diabetici una disbiosi caratterizzata da un aumento selettivo di patogeni opportunisti e una riduzione di batteri produttori di metaboliti utili, come il butirrato (Qin, 2012).

Zhang et al. hanno evidenziato cambiamenti specifici nella composizione del microbiota intestinale in ogni fase dello sviluppo del diabete. In particolare è stata riscontrata una riduzione dell'abbondanza relativa di batteri produttori di butirrato in parallelo alla riduzione della tolleranza al glucosio (Zhang, 2013). L'effetto benefico del butirrato è stato confermato da uno studio di Vrieze et al. in cui soggetti diabetici hanno ricevuto un trapianto di microbiota fecale da donatori magri non diabetici, che ha indotto la crescita di batteri produttori di butirrato e un miglioramento della sensibilità all'insulina (Vrieze, 2012).

#### Epatossteatosi

La NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) rappresenta un ampio spettro di condizioni clinico-istologiche che vanno dall'accumulo di grasso intracellulare epatico alla steatoepatite nella quale è presente una componente necroinfiammatoria, fino alla cirrosi e al carcinoma epatico. Negli ultimi anni la patogenesi della NAFLD è stata legata alla sindrome metabolica. Le biopsie epatiche di pazienti obesi mostrano steatosi nell'80% dei casi, e di questi nel 20-30% vi è fibrosi (Shalhub et al., 2004). Fattori di rischio per la NAFLD sono l'obesità, la sindrome metabolica, il diabete mellito tipo II e la dislipidemia (Angulo P, 2002). Si è soliti classificare la NAFLD come: 1) primaria (dovuta a condizioni associate a insulino-resistenza); 2) secondaria (a farmaci come amiodarone, estrogeni, corticosteroidi, nifedipina, diltiazem; a procedure chirurgiche come resezioni del piccolo intestino e by-pass digiuno-ileale; a nutrizione parenterale nel caso in cui le miscele contengano troppi glicidi, miscele non bilanciate di lipidi e scarsa colina; a tossici ambientali e chimici, a malattia di Weber Christian); 3) idiopatica, cioè da causa incerta (eccessiva crescita dei batteri intestinali, emocromatosi, epatite cronica HCV correlata, ecc.).

Da alcuni anni anche il microbiota intestinale sembra influire sulla patogenesi della NAFLD, sia attraverso la produzione di LPS e quindi la stimolazione della cascata delle citochine come il TNF $\alpha$ , sia attraverso la produzione in anaerobiosi di acetaldeide da piruvato, con successiva riduzione di essa a etanolo (Logan et al., 2000). Tale ipotesi è sostenuta

dall'evidenza che l'uso di antibiotici come la polimixina B e il metronidazolo, o l'uso di probiotici, possano migliorare l'epatossteatosi sia nel ratto sia nell'uomo.

In soggetti obesi affetti da NAFLD è stata riscontrata una maggiore prevalenza di sovraccrescita batterica nel piccolo intestino e una maggiore permeabilità intestinale, variabili correlate alla gravità della steatosi epatica (Festi et al., 2014). In pazienti sottoposti a by-pass gastrico a scopo bariatrico è stato ipotizzato che il miglioramento della NAFLD possa essere legato anche a variazioni del microbiota.

#### Aterosclerosi

L'insulino-resistenza, che come in precedenza discusso è legata a un'alterazione del microbiota intestinale, è una condizione che non solo rappresenta una tappa verso il diabete mellito, ma è implicata anche nell'aterosclerosi (Federici, 2010).

Il legame tra microbiota intestinale e aterosclerosi passa anche attraverso altre vie metaboliche, in particolare la produzione di trimetilamina-N-ossido (TMAO) a partire da carnitina e fosfatidilcolina assunte con la dieta, come osservato in diversi studi su modelli murini e su individui affetti da patologia cardiovascolare (Koeth et al., 2014; Koeth et al., 2013; Tang et al., 2013; Wang et al., 2014). Tali studi hanno dimostrato che la produzione di TMAO dopo somministrazione orale di carnitina e/o colina è strettamente dipendente dal microbiota, essendo fortemente ridotta a seguito di un recente ciclo di terapia antibiotica ad ampio spettro. Koeth et al. hanno evidenziato che la produzione di TMAO, dopo carico di carnitina, si è rivelata significativamente più elevata negli individui onnivori rispetto a una popolazione vegetariana/vegana (Koeth et al., 2013). La progressione dell'aterosclerosi promossa da TMAO è ascrivibile a interferenze multiple nel metabolismo del colesterolo, ad esempio a livello del trasporto inverso e della clearance biliare. Sul piano clinico, un elevato livello sierico di TMAO si è dimostrato un fattore di rischio indipendente di prevalenza e incidenza di patologia cardiovascolare nell'arco di un follow-up di 3 anni in un'ampia coorte di pazienti (Koeth et al., 2013; Tang et al., 2013; Wang et al., 2014). Parimenti, un elevato livello sierico di TMAO si è confermato un valido fattore prognostico di mortalità a 5 anni in una coorte di oltre 700 pazienti con scompenso cardiaco su base ischemica e non ischemica (Tang et al., 2014).

Da uno studio di Yang et al. è emerso anche un possibile legame tra disbiosi e ipertensione arteriosa. In particolare, è stato osservato un aumento del rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* in due modelli di ratto affetti da ipertensione, con una diminuzione dei batteri produttori di acetato e butirrato (Yang et al., 2015). Queste evidenze dimostrano il coinvolgimento del microbiota a vari livelli della genesi dei fattori di rischio cardiovascolare e suggeriscono la possibilità di modulare il microbiota al fine di migliorare gli outcome cardiovascolari.

Con queste premesse, Gan et al., hanno dimostrato che la somministrazione di *Lactobacillus rhamnosus* in un modello murino di cardiopatia ischemica ha attenuato il rimodellamento post-ischemico e diversi parametri emodinamici correlati allo scompenso cardiaco, tracciando il sentiero per futuri trial interventistici sull'essere umano (Gan et al., 2014).

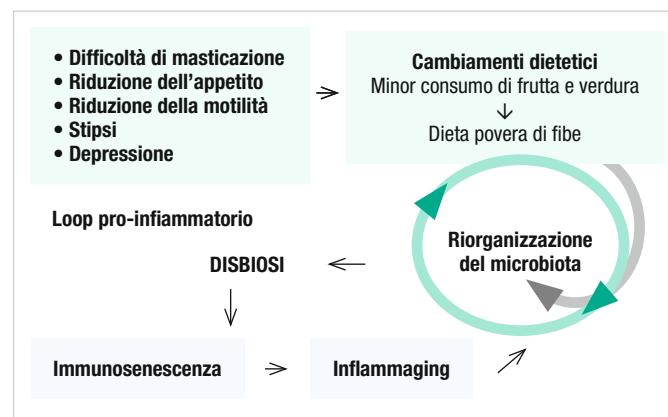
## Effetto sul muscolo

**Il microbiota interviene nella salute muscolare.** Un riscontro comune osservato nella pratica clinica quotidiana e ampiamente documentato dalle evidenze di letteratura è rappresentato dalla riduzione della massa muscolare e della sua funzione nell'invecchiamento. Si tratta di un fenomeno il cui esordio inizia a manifestarsi prima dell'età anziana. Landi et al. hanno dimostrato, in un'indagine su oltre 3.200 soggetti di età compresa tra 18 e 98 anni, come la riduzione della massa muscolare misurata dalla circonferenza di braccio e polpaccio del lato dominante e della forza muscolare rilevata mediante hand-grip sia presente già nella fascia di età tra i 45 e i 49 anni (Landi et al., 2017). La sarcopenia, ovvero la riduzione della massa e della funzionalità muscolare che si verifica con l'invecchiamento, si accompagna a un ampio spettro di outcome negativi, come disabilità motoria, cadute, isolamento sociale, ridotta qualità della vita e necessità di istituzionalizzazione e può quindi rappresentare il substrato biologico per lo sviluppo della fragilità, verso cui vanno definite le strategie più efficaci ai fini della sua prevenzione. Tra i fattori in grado di contribuire o accelerare la perdita di massa e funzione muscolare vanno ricordati la malnutrizione, lo stress ossidativo e stati infiammatori. È stato evidenziato un ruolo protettivo esercitato da alcuni nutrienti come alcuni aminoacidi (ad es. la leucina) e la vitamina D (Barillaro et al., 2013).

Un aspetto particolarmente interessante riguarda il ruolo giocato dal microbiota intestinale nel favorire un percorso metabolico che consenta di ottimizzare gli effetti delle sostanze nutritive introdotte con la dieta sulla fisiologia muscolare. Nei soggetti in età avanzata l'ospedalizzazione, l'uso frequente di antibiotici, una dieta sbilanciata, la presenza di dismotilità e di ipocloridria da gastroresezione funzionale farmacologica legata al diffuso utilizzo di inibitori di pompa protonica, insieme alla ridotta efficienza della barriera intestinale, sono fattori a monte di una disbiosi che può comportare traslocazione batterica, diarrea, dismetabolismo, infiammazione e sovraccarica microbica. Oggi **nel soggetto anziano si parla, infatti, con sempre maggior frequenza di "inflammaging", ovvero di uno stato di infiammazione cronica sistematica di basso grado che contribuisce all'insorgenza delle principali patologie età-correlate, in cui un ruolo centrale sarebbe giocato proprio dall'invecchiamento del microbiota intestinale.** L'alimentazione gioca un ruolo cruciale nel modulare la composizione del microbiota intestinale nel soggetto anziano, in cui la perdita del gusto e dell'olfatto, la difficoltà di masticazione, l'edentulità, la disfagia sono tra le cause che possono aumentare il rischio di malnutrizione (Fig. 6).

Lo stile dietetico nell'anziano è frequentemente di scarsa qualità con un maggior consumo di alimenti ad alto contenuto di zuccheri e grassi e un ridotto consumo di proteine, fibre, frutta, verdura e liquidi (Cevenini et al., 2010).

Esiste un parallelismo tra il tipo di alimentazione e la composizione del GM. Uno studio, condotto in una comunità di soggetti in età avanzata istituzionalizzati in case di riposo, ha evidenziato come la composizione del microbiota fosse differente da quella di soggetti di analoghe caratteristiche demografiche ed etniche non residenti in strutture protette per anziani. La permanenza in residenze per anziani (RSA) si correlava, in



**Figura 6.**

Microbiota intestinale e invecchiamento: rischi e conseguenze.

particolare, a un forte sbilanciamento nella composizione del microbiota verso i *Bacteroidetes* (Claesson et al., 2012). Analizzando il tipo di alimentazione, è stato dimostrato che mentre gli anziani in comunità avevano una dieta ricca di fibre vegetali e a basso o medio contenuto lipidico, i soggetti lungo-permanenti in RSA presentavano una nutrizione a elevato contenuto lipidico e scarso apporto di fibre. La modifica della dieta in questi due setting sposta la bilancia tra uno stato di salute e uno di fragilità, che vede tra i substrati principalmente coinvolti il sistema muscolare.

**Una disbiosi favorita da una dieta non adeguata comporta l'insorgenza di uno stato flogistico che a livello muscolare si estrinseca in una ridotta sintesi proteica e quindi sarcopenia, e di una infiammazione sistematica che determina alterazioni patologiche in vari organi e sistemi e insorgenza di fragilità** (Cevenini et al., 2010).

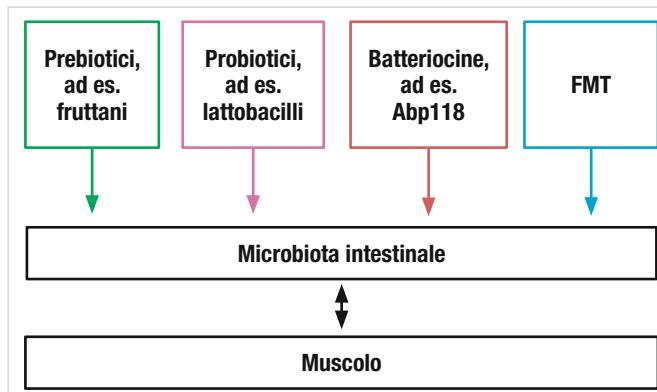
Il microbiota intestinale modula la disponibilità di aminoacidi e la somministrazione di ceppi specifici di probiotici come alcuni Lattobacilli, si associa a un pattern aminoacidico fecale particolare. (Torrallardona et al., 2003).

Inoltre il microbiota intestinale esercita un effetto indiretto sulla sintesi proteica attraverso il rilascio di acido linoleico, acetato e sali biliari che raggiungono il tessuto muscolare in cui producono effetti metabolici (Martin et al., 2010).

Esiste dunque una chiara plausibilità biologica di un dialogo tra microbiota intestinale e muscolo scheletrico e quindi, **ai fini di una preservazione del tessuto muscolare e della sua funzionalità, il microbiota potrebbe rappresentare un nuovo target terapeutico** (Fig. 7) (Bindels, 2013).

## Effetto sulla funzionalità renale

Nelle malattie renali il rene perde progressivamente la capacità di eliminare sia le sostanze provenienti dal metabolismo umano, sia quelle prodotte dall'attività metabolica del microbiota intestinale che tendono ad accumularsi in circolo non potendo essere eliminate per via urinaria. **La diminuita capacità detossificante del rene influisce sulla composizione del microbiota** residente nel tratto gastrointestinale, **che contribuisce con la sua attività metabolica a peggiorare il quadro**



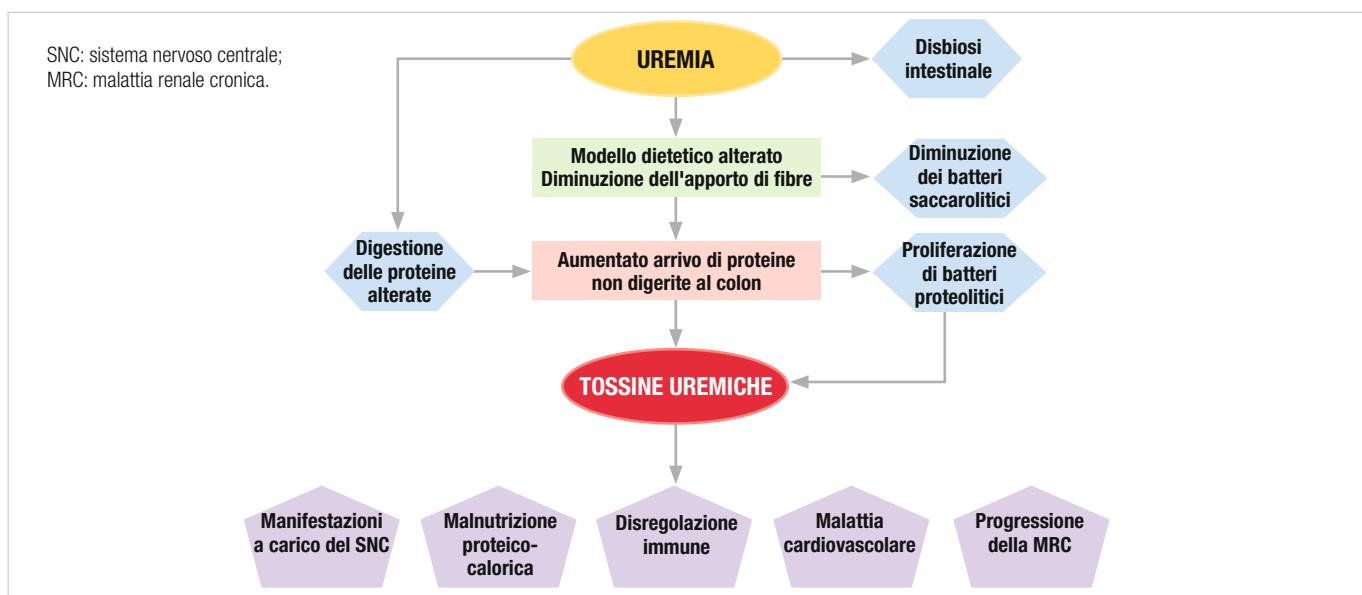
**Figura 7.**

Considerate le interazioni con il muscolo, il microbiota può rappresentare un nuovo e interessante target terapeutico volto a migliorare la funzionalità delle fibre muscolari (da Bindels e Delzenne, 2013, mod.).

**clinico** (Vaziri et al., 2013). In corso di insufficienza renale, l'intestino supplisce parzialmente al ruolo di organo emuntore con escrezione di urea che modifica il microambiente chimico e determina un'alterazione nella composizione del microbiota in senso disbiotico. Nel lume intestinale, l'escrezione di urea comporta in particolare un innalzamento del pH e quindi una pressione selettiva a favore di batteri urea-degradatori capaci di convertire l'urea in ammoniaca. Lo shift urea-indotto verso una popolazione batterica differente comporta una serie di effetti a cascata che interessano la barriera intestinale e il sistema immunitario. La produzione di ammoniaca determina infatti una degradazione dello strato protettivo di muco e un'alterazione della permeabilità intestinale per distruzione delle

tight junction, con traslocazione di materiale batterico attraverso la mucosa e l'attivazione di un meccanismo infiammatorio cronico locale e sistematico, sostenuto da uno sbilanciamento del sistema immunitario (Anders et al., 2013). Ma non solo. **Nel paziente nefropatico, il tipo di alimentazione seguita che frequentemente è caratterizzata da una forte restrizione delle fibre vegetali, sbilancia il metabolismo batterico verso una putrefazione proteolitica a scapito di quella saccarolitica, con produzione di tossine uremiche** come p-cresil solfato (PCS) e indossile solfato (IS), che derivano dalla degradazione degli aminoacidi aromatici, quali triptofano, fenilalanina e tirosina, e TMAO (*Trimethylamine N-Oxide*), derivato dal catabolismo di prodotti essenzialmente di origine animale, contenenti colina, fosfatidilcolina, carnitina e betaina. PCS e IS, che nei pazienti con malattia renale cronica raggiungono livelli anche cento volte più elevati rispetto ai soggetti sani, sono sostanze **caratterizzate da un'attività profibrotica, pro-infiammatoria e di induzione di stress ossidativo a livello renale e cardiovascolare**. Inoltre, queste due sostanze si legano con elevata avidità all'albumina, per cui non vengono eliminate efficacemente in corso di dialisi, contribuendo ad aggravare l'intossicazione uremica nel paziente dializzato. L'insufficienza renale, quindi, oltre a favorire un effetto tossico diretto dei prodotti del metabolismo dei microrganismi presenti nell'intestino, induce una modificazione in senso disbiotico nella composizione del microbiota che peggiora il quadro clinico (Fig. 8).

**Nella malattia renale cronica il microbiota dovrebbe essere considerato un nuovo fattore di rischio non tradizionale**, modificabile grazie a un programma nutrizionale che, insieme ai capisaldi come la restrizione proteica e di sale, preveda l'inserimento di fibre, come avviene per esempio nel caso della dieta mediterranea, una dieta considerata naturalmente



**Figura 8.**

Il legame tra insufficienza renale e alterazioni tossiche facilitate dall'alterazione del metabolismo del microbiota intestinale (da Ramezani et al., 2016, mod.).

prebiotica, capace di spostare l'equilibrio del metabolismo batterico in direzione saccarolitica, e la somministrazione di probiotici con attività antiossidanti e antinfiammatorie.

### Relazione tra microbiota intestinale e cervello

**Tra intestino e cervello esiste una comunicazione bidirezionale non solo a livello nervoso, ma anche endocrino e immunitario, così strettamente influenzata dal microbiota da avere fatto coniare il termine di “asse cervello-intestino-microbiota”** (Greenham et al., 2011).

L'impatto socio-sanitario delle patologie psichiatriche, la maggiore attenzione delle istituzioni alle strategie mirate a migliorare la salute mentale della popolazione e la consapevolezza che gli interventi preventivi in tal senso hanno ottenuto solo modesti risultati, sono alla base del crescente interesse per lo studio della comunicazione tra microbiota, intestino e cervello, che è una delle più attraenti aree di ricerca emerse dalle neuroscienze (Logan, 2005).

È stato evidenziato che questa comunicazione ha luogo attraverso vari meccanismi: innanzitutto l'apparato gastrointestinale, in particolare il colon, è sede di cospicua innervazione, in grado di inviare informazioni al cervello attraverso i terminali afferenti del nervo vago; studi preclinici hanno dimostrato che i microrganismi che compongono il microbiota influenzano l'attività vagale che determina, a cascata, un'attivazione del sistema immunitario utile a contrastare fenomeni disbiotici a livello intestinale.

Inoltre, **il microbiota, attraverso la produzione di metaboliti influenza sia la produzione di citochine proinfiammatorie** (Foster et al., 2013), **sia i livelli di triptofano** e di acido kinurenico, un suo metabolita con proprietà neuroprotettive (Desbonnet et al., 2008). Infine, alcuni batteri producono direttamente neurotrasmettitori come serotonina e l'acido gamma-amino-butirrico (GABA) e fattori di crescita come il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF) (Cryan et al., 2012).

Bisogna ricordare che esistono similitudini strutturali tra barriera intestinale e barriera ematoencefalica (BEE). La BEE è un'unità neurovascolare complessa formata da cellule endoteliali del SNC che separano il lume dei vasi sanguigni dal parenchima cerebrale (Kelly, 2015). TJ, astrociti e periciti sigillano le cellule epiteliali dei capillari e le proteine trans-membrana delle TJ limitano la diffusione paracellulare di sostanze idrosolubili dal sangue all'encefalo.

Studi recenti condotti in topi GF suggeriscono un'attività di modulazione della BEE da parte del microbiota. L'esposizione di topi GF adulti a microbiota fecale proveniente da donatori privi di germi patogeni riduce la permeabilità della BEE e aumenta l'espressione di proteine delle TJ. Inoltre la colonizzazione dell'intestino di topi GF con ceppi batterici produttori di SCFA normalizza la permeabilità della BEE e, in aggiunta, il butirrato di sodio è stato in particolare associato a una aumentata espressione di occludine nella corteccia frontale e nell'ippocampo. Uno studio di imaging ha dimostrato che l'acetato prodotto dal microbiota può attraversare la BEE andando a modificare l'espressione genica dell'ipotalamo (Kelly, 2015). Questi studi corroborano dunque l'ipotesi di un legame tra BEE e modificazioni del microbiota intestinale.

Come prima ricordato, **una funzione cardine del microbiota è la partecipazione allo sviluppo e al mantenimento della barriera intestinale lungo tutto l'arco della vita**. È allora plausibile che anche lievi alterazioni nella composizione del microbiota nelle prime fasi della vita possano rappresentare un fattore di vulnerabilità con ripercussioni sulle vie di segnale neuroendocrino e neuroimmunitario lungo l'asse cervello-intestino microbiota, in grado di predisporre nella vita adulta a disordini stress-correlati. Il microbiota gioca, infatti, un ruolo importante per lo sviluppo dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (Moloney et al., 2014) e la composizione del microbiota costituisce un elemento cruciale: **una minore biodiversità microbica contribuisce a un aumento di disturbi infiammatori cronici e sviluppo di sottotipi di depressione** (Rook, 2014). Una barriera intestinale disfunzionale può, pertanto, facilitare uno stato pro-infiammatorio microbiota-guidato, con ripercussioni a livello cerebrale. Un aumento della permeabilità intestinale (*leaky-gut*) potrebbe infatti essere implicata nel mantenimento ed esacerbazione di risposte infiammatorie di basso grado, causa di neuroinfiammazione.

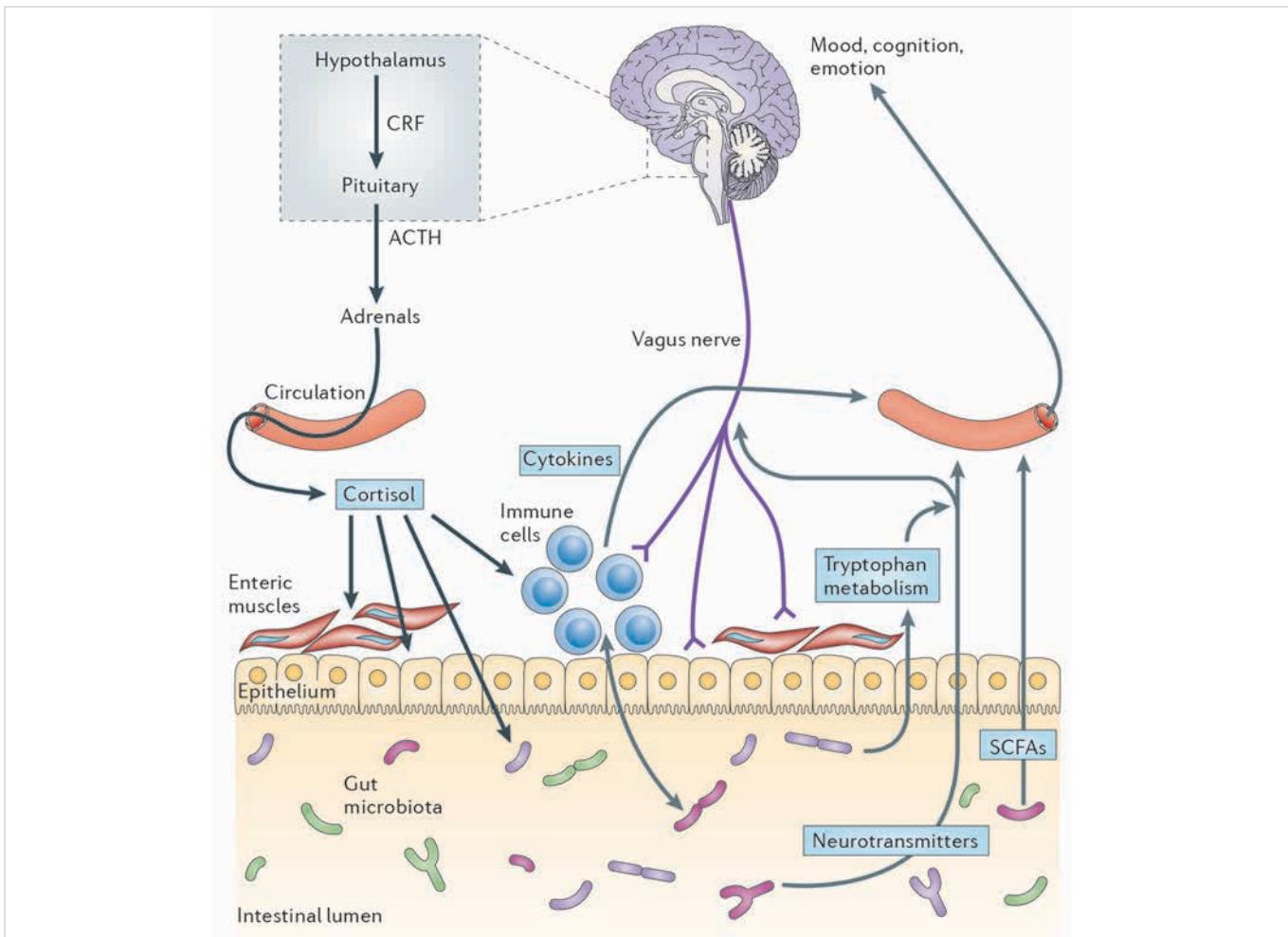
**Nell'interazione tra microbiota e cervello giocano un ruolo importante gli SCFA, che agiscono come neuro-ormoni**, ma anche gli effetti che i microrganismi esercitano sul sistema serotoninergico gastrointestinale (Fig. 9).

I più abbondanti depositi di serotonina (5-HT) si trovano infatti nelle cellule enterocromaffini. È stato evidenziato che il sistema serotoninergico è influenzato dal microbiota soprattutto, ma non esclusivamente, in fasi precoci della vita, quando il microbiota stesso è in evoluzione verso la forma stabile della vita adulta. Si è riscontrato che il microbiota interviene nella regolazione della sintesi e della secrezione di 5-HT (Kelly, 2015). La comunicazione, ormai ampiamente dimostrata fra microbiota e cervello, e la riconosciuta influenza reciproca dei due sistemi, spingono a ricerche sempre più approfondite volte a caratterizzare con migliore precisione le numerose specie di microrganismi commensali che compongono il microbiota umano, in modo da potere selezionare ceppi più utili per intervenire positivamente sul mantenimento e sul ripristino della funzionalità della barriera intestinale, vero direttore d'orchestra della salute dell'organismo.

Le più approfondite conoscenze sul cross-talk tra microbiota e cervello hanno condotto a studi preclinici e clinici volti a verificare le ricadute, da un punto di vista psichiatrico, delle perturbazioni del microbiota e l'effetto dell'utilizzo di integrazioni con ceppi selezionati di probiotici sullo stress e sui sintomi dei disturbi della sfera mentale.

La composizione del microbiota si modifica in funzione di diversi fattori tra cui uno dei principali è rappresentato dalla dieta. Come ricordato nel primo capitolo, **una dieta di tipo occidentale, ricca in grassi saturi e zuccheri modifica il microbiota verso una composizione microbica il cui metabolismo risulta pro-infiammatorio**.

Alla luce delle ricerche della “psichiatria nutrizionale” emerge come i **pattern dietetici non salutari tipici del western lifestyle basati ad esempio sull'utilizzo di cibi processati e raffinati, bevande altamente zuccherine e snack a elevato contenuto di sodio si associno a un maggiore rischio di**



**Figura 9.**

Percorsi coinvolti nella comunicazione bidirezionale tra il microbiota intestinale e il cervello (Reprinted by permission from Spring Nature, *Nature Reviews Neuroscience*. Cryan JF, Dinan TG. *Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour*. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Oct;13(10):701-12. doi: 10.1038/nrn3346. Epub 2012 Sep 12).

**sviluppo di morbilità di ordine psichiatrico, come depressione e disturbi del comportamento**, specialmente se adottati nei primi anni di vita. Al contrario **regimi dietetici di tipo tradizionale, come la dieta mediterranea o quella giapponese, ricche di frutta, verdura e pesce, si associano a una riduzione di circa il 25-30% del rischio di depressione**. Inoltre, studi epidemiologici evidenziano un più elevato rischio di depressione in soggetti sani con insulino-resistenza. Sintomi depressivi si correlano con elevati livelli di glicemia a digiuno e dopo stimolazione, in adolescenti a rischio di diabete tipo 2 (Selhub, 2014).

Va ricordato che alcuni nutrienti sono stati associati a proprietà antidepressive, come i polifenoli, o prodotti fitoderivati e micronutrienti come magnesio, zinco, vitamina C, acido folico. Le vitamine del gruppo B agiscono contro lo stress ossidativo e come antinfiammatori e giocano un ruolo nella sintesi dei neurotrasmettitori. **Il peso dello stress ossi-**

**dativo e dell'infiammazione sta sempre più emergendo come un elemento in grado di influenzare direttamente lo stato dell'umore in un circolo vizioso**. La presenza di una elevata concentrazione sistemica di citochine infiammatorie può indurre l'attivazione di infiammazione nel SNC, attraverso attivazione della microglia, con compromissione del funzionamento neuronale e innesco di una cascata di ulteriore infiammazione e stress ossidativo, che può manifestarsi con una compromissione della comunicazione neuronale intracellulari (Selhub, 2014).

L'infiammazione sistemica può essere innescata da una alterazione della permeabilità della barriera intestinale, come si verifica in seguito a dieta di tipo occidentale e in caso di stress psicologici ed esercizio fisico estremo, che determina il passaggio di frammenti batterici come LPS fortemente pro-infiammatori. È stato evidenziato che anche relativamente moderate elevazioni nei livelli sistemici di LPS si associano a sin-

tomi depressivi e disturbi del controllo del glucosio. Inoltre una elevata concentrazione di LPS può ridurre la disponibilità di triptofano e zinco, influenzando negativamente la trasmissione nervosa. I livelli di LPS sono fortemente influenzati dal tipo di dieta: un regime alimentare di tipo tradizionale riduce dopo un mese di circa il 38% i livelli di LPS sistemicamente (Selhub, 2014).

È stato riscontrato in pazienti depressi un aumento delle concentrazioni di IgA e IgM dirette contro LPS di batteri commensali gram-negativi presenti nel microbiota (Maes, 2012).

Due studi trasversali hanno analizzato la composizione del microbiota in pazienti con depressione. Il primo ha riscontrato un aumento di *Bacteroides* e una riduzione di *Lachnospiraceae* rispetto ai controlli; il secondo studio ha documentato nel gruppo di pazienti depressi un incremento di *Enterobacteriaceae* e *Alistipes* e una riduzione di *Facalibacterium*, correlata con la severità dei sintomi depressivi (Selhub et al., 2014).

**Il microbiota intestinale è stato quindi indicato come un elemento cruciale del legame tra pattern dietetici e salute mentale** alla luce delle sue molteplici attività:

- protezione diretta della barriera intestinale;
- influenza sullo stato antiossidante locale e sistematico, riduzione della perossidazione lipidica;
- produzione diretta di neurotrasmettitori (GABA, serotonina);
- influenza indiretta sui neurotrasmettitori o sulla produzione di neuropeptidi;
- prevenzione delle alterazioni indotte dallo stress al microbiota intestinale;
- attivazione diretta dei processi neurali tra intestino e cervello;
- limitazione della produzione di citochine infiammatorie;
- modulazione di sostanze chimiche neurotrophiche, tra cui brain-derived neurotrophic factor (BDNF);
- limitazione del malassorbimento dei carboidrati;
- miglioramento dello stato nutrizionale, per esempio, omega-3, minerali, fitochimici alimentari;
- limitazione della sovraccrescita batterica nel piccolo intestino;
- riduzione del carico di ammine o tossine uremiche;
- limitazione di agenti patogeni gastrointestinali (per esempio, *Helicobacter pylori*);
- proprietà analgesiche.

Molti studi preclinici e clinici hanno confermato gli effetti del microbiota sullo stato di salute mentale.

In studi condotti su topi GF è stato dimostrato che quando questi animali erano sottoposti a test stressanti esibivano meno comportamenti di evitamento o difesa, assimilabili a comportamenti che si osservano in condizioni di ansia nell'uomo (Diaz Heijtz, 2011). Viceversa, quando i topi GF venivano contaminati con microbiota intestinale di topi normali si è evidenziata una riduzione del comportamento esplorativo e un aumento di comportamenti correlati all'ansia (Bercik, 2011), confermando che la composizione del microbiota può influenzare il comportamento.

Queste osservazioni hanno fatto ipotizzare che modificare il microbiota attraverso terapie antibiotiche o probiotiche potesse ulteriormente modificare il comportamento. Nello studio su

topi descritto più sopra, i topi GF che dopo contaminazione da parte del microbiota di altri topi avevano manifestato atteggiamenti simil-ansiosi, dopo trattamento con una miscela di antibiotici e antifungini manifestavano una ripresa delle funzioni esplorative e una riduzione dei sintomi correlati all'ansia. Anche **l'uso di probiotici, spostando l'equilibrio e la composizione del microbiota intestinale, ha dimostrato di indurre modificazioni del comportamento**. In uno studio su topi separati dalla madre in età neonatale, il trattamento con *Bifidobacterium infantis* riduceva i sintomi di tipo depressivo (Desbonnet, 2010), mentre in uno studio successivo su topi trattati con *L. rhamnosus* si osservava la riduzione di manifestazioni correlate ad ansia e depressione in topi sottoposti a stress test (Bravo, 2011).

Gli studi preclinici descritti hanno dato il via a studi condotti sull'uomo che, sebbene preliminari, hanno evidenziato alcune proprietà ansiolitiche del trattamento con probiotici.

In uno studio, soggetti sani trattati con *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum* avevano, dopo 30 giorni di trattamento, punteggi più bassi alla *Hospital Anxiety and Depression Scale* rispetto a quelli trattati con placebo (Messaoudi, 2011). Un altro lavoro effettuato attraverso risonanza magnetica funzionale ha dimostrato una riduzione delle connessioni fra diverse regioni telencefaliche e amigdala in donne sane trattate con probiotici, dimostrando un'attività dei probiotici nel modulare la connettività di quelle zone del cervello implicate nella reattività emotionale e nell'ansia (Tillisch, 2013).

Risultati positivi sono stati ottenuti anche su soggetti affetti da sindrome da affaticamento cronico trattati con *Lactobacillus casei* per 2 mesi, che miglioravano in maniera clinicamente significativa rispetto al gruppo di pazienti trattati con placebo, come evidenziato dalla riduzione dei punteggi delle scale di Beck di ansia e depressione (Rao, 2009). In un recente studio in doppio cieco, 20 pazienti con carcinoma della laringe testati prima dell'intervento chirurgico esperivano una riduzione dei livelli di ansia relativa al prossimo intervento chirurgico dopo 2 settimane di trattamento con il probiotico *Clostridium butyricum* rispetto a placebo (Yang 2016).

Un altro studio ha valutato gli effetti di una miscela di probiotici (*Bifidobacteri* e *Lattobacilli*) sulla reattività cognitiva a normali e momentanee deflessioni del tono dell'umore, considerata un marker di vulnerabilità per lo sviluppo di depressione (Steenbergen et al., 2015). Nello studio randomizzato, in cieco e controllato verso placebo sono stati inclusi 40 soggetti (senza alcun disturbo psichiatrico/neurologico o storia familiare di depressione o emicrania) che sono stati suddivisi in due gruppi di 20 soggetti ciascuno, trattati per 4 settimane uno con una miscela probiotica l'altro con prodotto inerte.

La reattività cognitiva è stata valutata, pre- e post-intervento, mediante il *Leiden Index of Depression Sensitivity* (Leids-R). Si tratta di un questionario auto-somministrato a 34 item che valuta in quale misura vengano attivati pensieri disfunzionali in caso di deflessione del tono dell'umore. I punteggi del Leids-R sono risultati predittivi circa l'incidenza di depressione in diversi studi longitudinali e correlati con i fattori di rischio della depressione, come storia familiare di depressione, marcatori genetici della depressione, e la reazione alla deplezione di triptofano.

I risultati di questo studio non hanno mostrato un cambiamento significativo per quanto concerne la reattività cognitiva misurata pre- e post-intervento nel gruppo dei soggetti trattati con placebo; al contrario, i soggetti che hanno assunto probiotici nel corso delle 4 settimane di intervento hanno mostrato nella valutazione post intervento, rispetto ai punteggi ottenuti al Leids-R nel pre-intervento, una riduzione statisticamente significativa soprattutto per quanto concerne due pattern disfunzionali di pensiero, cioè quello aggressivo e quello ruminativo. Studi preclinici suggeriscono inoltre che il microbiota intestinale possa modulare i comportamenti associati a disordini del neurosviluppo, come i disordini dello spettro autistico e la schizofrenia (Desbonnet, 2014; Hsiao, 2013; Mayer, 2014). **L'aumentata permeabilità della barriera intestinale e di quella ematoencefalica indotta dalla disbiosi potrebbe svolgere un ruolo nella patogenesi del morbo di Alzheimer e delle altre malattie neurodegenerative, come la sclerosi multipla (SM).** In studi su uomo, il trapianto di fagi da individui sani in soggetti con SM ha indotto un miglioramento delle condizioni motorie. Inoltre il confronto tra microbiota intestinale di soggetti con SM recidivante remittente e individui sani ha mostrato una riduzione di batteri produttori di SCFA (soprattutto butirrato e propionato) (Miyake et al., 2015; Jangi et al., 2016). In una recentissima review sono state determinate le abbondanze relative dei diversi phyla del microbiota intestinale di pazienti con SM e di soggetti sani di controllo (Mowry et al., 2018). La review ha evidenziato nei pazienti con malattia neurologica una riduzione della concentrazione di batteri produttori di SCFA, che comporta una riduzione della produzione di citochine antinfiammatorie. È significativo il riscontro di una riduzione di *Fecalibacterium* e una aumentata abbondanza relativa di *Akkermasia muciniphila*. Questo dato accomuna tutti gli studi più robusti sull'argomento presenti in letteratura. La sovra-presenza di *Akkermasia* può determinare una eccessiva degradazione del muco con una vulnerabilità dell'epitelio intestinale, che determina una maggiore permeabilità a sostanze tossiche.

### Modulazione della flogosi

Come abbiamo visto nel primo capitolo di questa monografia, la composizione del microbiota e i suoi prodotti metabolici giocano un ruolo centrale nel mantenimento di un'omeostasi del sistema immunitario e quindi nella modulazione dell'infiammazione.

L'alimentazione determina una pressione selettiva verso la predominanza di specifici ceppi batterici in funzione del substrato energetico prevalente, in modo da consentire all'organismo di sfruttare al meglio il contenuto energetico dell'apporto alimentare. Una nutrizione ricca di fibre vegetali e quindi zuccheri complessi favorisce la crescita di specie come i *Bacteroidetes* che sfruttano una fermentazione di tipo saccarolitico per l'estrazione di energia, mentre un'alimentazione di tipo più occidentale, ricca di grassi animali, favorisce la predominanza di specie come i *Firmicutes* con attivazione di un metabolismo basato sulla putrefazione proteolitica (David et al., 2014).

La bilancia tra fermentazione saccarolitica e putrefazione proteolitica dovrebbe pendere a favore della prima, a causa dei diversi effetti fisiologici dei metaboliti a valle delle due vie. Il

tipo di metabolismo produce infatti effetti sistemici che non si limitano alla semplice estrazione di energia dal substrato, ma che si riverberano sullo stato di salute dell'organismo. **Con la fermentazione saccarolitica si ha la produzione degli SCFA che, oltre a inibire la crescita dei patobionti, sono dotati di un'azione trofica per l'epitelio del colon e di un'azione endocrina locale e sistemica. Sono anche caratterizzati da un'attività antinfiammatoria**, esercitata in modo diretto sia tramite un *signaling* su alcune cellule del sistema immunitario, sia grazie all'induzione, attraverso meccanismi epigenetici, del differenziamento dei linfociti T Reg con attivazione di un fenotipo tolerogenico, piuttosto che proinfiammatorio.

I prodotti microbici (MAMPs/PAMPs) come SCFA, polisaccaride A (PSA), lipopolisaccaride (LPS) e flagelline o *Microbial Anti-Inflammatory Molecule* (MMA) sono gli elementi che fanno "dialogare" i microrganismi con il sistema immunitario: si tratta di prodotti del metabolismo batterico o molecole superficiali che interagiscono con i recettori di superficie rappresentati dai TLR presenti sia sulle cellule epiteliali intestinali sia sulle cellule dendritiche. L'avvenuto riconoscimento attiva le vie interne molecolari dei TLR che avviano la produzione di citochine in senso infiammatorio o antinfiammatorio (Abbas et al., 2015).

Un ruolo cruciale è svolto dalle cellule dendritiche (DC) da cui dipende l'attivazione di una risposta da parte del sistema immunitario di tipo Th1 o Th2.

Una vita sedentaria e una dieta di tipo occidentale promuove **una modificazione del microbiota in senso disbiotico** con aumento del rapporto tra batteri a metabolismo prevalentemente proteolitico e batteri a metabolismo saccarolitico e minore biodiversità. Questa modificazione **induce infiammazione intestinale e alterazione dell'immunità intestinale** mediata dall'attivazione della via Th1 con diminuzione del rapporto Treg/Th17 nella mucosa intestinale, aumento degli acidi biliari in grado di interferire con la vitamina D, aumento di LPS e della permeabilità della barriera intestinale e produzione di citochine infiammatorie come TNF $\alpha$ . Tali cambiamenti, a causa del passaggio attraverso la barriera intestinale di LPS, peptidi, proteine, cellule T attivate e batteri intestinali inducono una infiammazione sistemica con una lieve (*low-grade*) endotossiemia ( $> 200$  pg/ml LPS) (Tilg et al., 2009).

In presenza invece di un metabolismo microbico prevalentemente saccarolitico, metaboliti come gli SCFA inducono le DC ad attivare una risposta di tipo Th2, in cui si verifica una stimolazione delle Treg mediata dalla produzione di citochine antinfiammatorie come IL-10, IL-4 e TGF $\beta$ . **Le DC possono quindi se opportunamente stimolate spegnere un processo flogistico.**

È stato ad esempio osservato come prodotti finali della fermentazione di fibre da parte dei batteri anaerobi intestinali (come PSA e SCFA) riducono la severità di encefalite autoimmune sperimentale (EAE) e l'attività di Th1 e Th17 (Lee et al., 2011). L'azione antinfiammatoria è anche indiretta, attraverso la upregolazione delle TJ, fenomeno che migliora la funzionalità delle barriere intestinali con conseguente azione antinfiammatoria sistemica.

### Effetto antiossidante

Tra le svariate attività esercitate dal microbiota intestinale, un

aspetto su cui stanno puntando diversi gruppi di ricerca riguarda l'effetto antiossidante dei microrganismi presenti nel tratto digerente. L'interesse nasce dall'ormai ben riconosciuto effetto patogeno esercitato dallo stress ossidativo, cioè dal complesso di effetti negativi esplicati a livello delle strutture cellulari dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) non adeguatamente contrastate dai sistemi antiossidanti endogeni tra cui, in particolare, il glutathione ridotto (GSH) e la superossidodismutasi (SOD).

Vari ceppi di probiotici, e in modo particolare il *Bifidobacterium lactis* BS05, sono infatti allo studio per quanto riguarda il potenziale effetto contro lo stress ossidativo mediato da ROS, con implicazioni di carattere clinico di grande interesse potenziale. È stato dimostrato che il microbiota è in grado di regolare, attraverso il metabolismo della glicina, la disponibilità di glutathione (Mardinoglu et al., 2015).

Diversi studi hanno riportato effetti benefici dei probiotici nell'indurre una protezione contro lo stress ossidativo nell'uomo. In questo senso una selezione di ceppi batterici in grado di contrastare efficacemente i radicali liberi può essere utilizzata per la produzione di supplementazioni efficaci nel prevenire lo stress ossidativo e le numerose patologie a questo correlate.

Inoltre bisogna ricordare che il microbiota, grazie all'enorme corredo di enzimi a esso correlato, permette la trasformazione di composti presenti nella dieta, rendendo disponibili maggiori quantità di antiossidanti presenti negli alimenti assunti.

È stato evidenziato anche come la supplementazione in ratti di probiotici sia in grado di indurre la trascrizione di geni coinvolti nella biosintesi del GSH a livello della mucosa intestinale e aumentare la sintesi di GSH nelle cellule del pancreas (Lutendorff et al., 2008, 2009).

**Il microbiota può quindi potenziare il sistema di difesa antiossidante delle cellule dell'ospite.**

## Keypoints

- La duplice funzione della barriera intestinale di difesa e di superficie di assorbimento e permeabilità di nutrienti, acqua ed elettroliti è regolata da fini processi in cui il ruolo del microbiota è sostanziale.
- Alterazioni della composizione del microbiota possono indurre una risposta pro-infiammatoria in grado di danneggiare le proteine che regolano la coesione cellulare dell'epitelio intestinale: si verifica un aumento della permeabilità intestinale che determina il passaggio di batteri e prodotti di derivazione batterica come il lipopolisaccaride (LPS) a livello sistematico, innescandosi uno stato di endotossiemia metabolica e di infiammazione.
- Il metabolismo del microbiota è un elemento cruciale al mantenimento dell'integrità della barriera intestinale e quindi a una condizione di salute dell'ospite e di omeostasi.
- L'eubiosi è il risultato di un insieme di condizioni individuo-specifiche che promuovono la crescita di gruppi micobici il cui metabolismo interagisce positivamente con il sistema immunitario, contribuendo a una funzionalità ottimale della barriera intestinale.
- La disbiosi è una composizione del microbiota dannosa per la salute, in cui si ha la riduzione dei batteri produttori di

SCFA, soprattutto di butirrato, l'aumentata degradazione del muco da parte di batteri degradatori della mucina, aumento di idrogeno solforato, tossico per l'epitelio, e l'aumento di abbondanza relativa di batteri proteolitici a effetto pro-infiammatorio.

- Le alterazioni del microbiota sono state correlate a disordini legati alla nutrizione (obesità, diabete tipo 2, sindrome metabolica), malattie infiammatorie croniche intestinali (colite ulcerosa e malattia di Crohn), disturbi funzionali intestinali (sindrome intestino irritabile), complicazioni sistemiche di epatopatie scompensate, malattie cardiovascolari, atopia/allergia, malattie renali e cancro colo-rettale.
- L'insufficienza renale oltre a favorire un effetto tossico diretto dei prodotti del metabolismo dei microrganismi presenti nell'intestino, induce una modificazione in senso disbiotico nella composizione del microbiota che peggiora il quadro clinico.
- Alterazioni nella composizione del microbiota nelle prime fasi della vita possono rappresentare un fattore di vulnerabilità con ripercussioni sulle vie di segnale neuroendocrino e neuroimmunitario lungo l'asse cervello-intestino-microbiota, in grado di predisporre nella vita adulta a disordini stress-correlati.
- L'aumentata permeabilità della barriera intestinale e di quella ematoencefalica indotta dalla disbiosi potrebbe svolgere un ruolo nella patogenesi del morbo di Alzheimer e delle altre malattie neurodegenerative, come la SM.
- Una modificazione del microbiota in senso disbiotico con metabolismo proteolitico induce infiammazione intestinale e alterazione dell'immunità intestinale.
- Un metabolismo micobico prevalentemente saccarolitico produce metaboliti come gli SCFA che inducono le DC ad attivare una risposta di tipo Th2, con produzione di citochine antinfiammatorie come IL-10, IL-4 e TGFbeta. Le DC possono quindi se opportunamente stimolate spegnere un processo flogistico.
- Alcuni ceppi probiotici sono particolarmente ricchi di glutathione, SOD e sostanze chelanti i metalli e agiscono di certo nel contrastare lo stress ossidativo: il microbiota può quindi potenziare il sistema di difesa antiossidante delle cellule dell'ospite.

## 3. I probiotici

### Effetto su organi e sistemi

La modificazione del microbiota intestinale verso una composizione più favorevole all'organismo ospite è una strategia a cui con sempre maggiore attenzione guarda la ricerca per le rilevanti potenzialità sulla promozione di uno stato di salute. Tuttavia la modulazione di questo complesso ecosistema non è un'impresa semplice, specialmente sul lungo periodo.

**Le possibilità attualmente disponibili per cercare di variare la composizione del microbiota intestinale passano dalle modificazioni dello stile di vita, dall'uso di antibiotici, dal ricorso a probiotici e prebiotici fino al trapianto di microbiota.**

Analizziamo brevemente ciascuna di queste possibili strade, focalizzando l'attenzione sul ruolo dei probiotici.

### Dieta

Dopo i 3 anni di età, momento della vita in cui il microbiota si stabilizza assumendo le caratteristiche riscontrate poi nella vita adulta, cambiamenti dello stile di vita, come alimentazione e attività fisica, possono indurre una modificazione della composizione del microbiota del 30-40%.

Dopo una situazione patologica acuta come una gastroenterite una dieta di pochi giorni a base di fibra e carboidrati complessi non determina modificazioni del microbiota, situazione che al contrario si verifica, in senso negativo, già a partire dal secondo giorno modificando la dieta con cospicuo apporto di proteine e grassi animali (David et al., 2014).

La dieta ha quindi un ruolo nel cronico ma non in acuto per incidere positivamente sul microbiota intestinale.

### Antibiotici

L'utilizzo di antibiotici ha ripercussioni significative sul microbiota. La somministrazione alla nascita è associata a cambiamenti di lunga durata (oltre un anno) della composizione di questo ecosistema, con riduzione dell'abbondanza relativa dei *Bacteroidetes*, un aumento dei *Proteobatteri* e del genere *Akkermansia* (Persaud, 2013). Alterazioni in senso negativo della composizione del microbiota si osservano all'estremo opposto: negli anziani il ricorso ad antimicrobici è tra le cause più frequenti di diarrea. Bisogna ricordare che in questi pazienti, in seguito a un uso esteso di antibiotici, si verificano spesso epidemie da *Clostridium difficile*, che possono evolvere verso quadri di colite pseudomembranosa (Milani et al., 2016). Tuttavia, in situazioni di sovraccrescita batterica, gli antibiotici possono avere una funzione di controllo utile.

### Prebiotici

**Un prebiotico è un costituente degli alimenti non vitale che conferisce un beneficio alla salute stimolando selettivamente la crescita, l'attività o entrambe, di uno o di un numero limitato di specie batteriche già residenti nel colon.**

I prebiotici sono sostanzialmente rappresentati da carboidrati complessi contenuti nelle fibre come l'arabinossilano, alcuni polisaccaridi presenti in alghe e microalghe, i fruttani come l'inulina e i galatooligosaccaridi.

I prebiotici vengono direttamente fermentati nel colon dai batteri endogeni ad acidi grassi saturi a corta catena, con una conseguente riduzione del pH. Mediante questo processo, essi possono esercitare effetti antinfiammatori, stimolando ad esempio l'aumento delle cellule T-reg e la riduzione di interferone e inoltre possono anche inibire l'aderenza dei patogeni all'epitelio intestinale prevenendone quindi il passaggio attraverso l'epitelio (Gallo et al., 2016).

### Simbiotici

Un'altra strategia per modulare il microbiota intestinale consiste nell'utilizzo dei cosiddetti simbiotici, prodotti nei quali probiotici e prebiotici si trovano in combinazione. In questo caso, i batteri vivi vengono somministrati insieme con specifici substrati per la crescita (prebiotici) e la combinazione, che migliora la sopravvivenza del probiotico (grazie alla presenza del

substrato disponibile immediatamente per la fermentazione), può essere vantaggiosa per l'ospite (Collins e Gibson, 1999).

### Trapianto di microbiota

Un approccio a cui si guarda con particolare interesse è la possibilità di effettuare un vero e proprio "trapianto" del microbiota intestinale, che consiste nell'infusione di una sospensione fecale da un individuo sano nell'intestino di un altro (Ojeda et al., 2016).

Tra i meccanismi d'azione indicati per il trapianto di microbiota vi sono la competizione per i nutrienti, l'inibizione diretta della crescita del patogeno, la modulazione del sistema immunitario dell'ospite.

È stato osservato che il microbiota intestinale dell'ospite risulta molto simile a quello del donatore due settimane dopo il trapianto: tale somiglianza persiste per più di un mese, con una predominanza di *Bacteroides* (Gallo et al., 2016).

Questo approccio si è dimostrato efficace nei pazienti con infezione da *C. difficile*, nei quali è risultato protettivo nel 90% dei casi (van Nood et al., 2013), ma anche in soggetti con sindrome metabolica, nei quali ha determinato la riduzione dei sintomi associati all'insulino-resistenza (Ojeda et al., 2016).

### Probiotici

I probiotici rappresentano una delle vie più interessanti per modificare beneficiamente la composizione del microbiota e modulare il metabolismo dell'ospite.

Secondo la definizione ufficiale della FAO (Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura delle Nazioni Unite) e dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) (FAO/WHO report, 2002), i probiotici sono "organismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite". Il termine probiotico significa "a favore della vita" (dalla particella latina pro, a favore di, e dall'aggettivo greco *biotikos*, da *bios*, vita).

Il concetto di probiotico nasce in realtà nei primi del 1900, quando il premio Nobel russo Elie Metchnikoff intuì che ceppi di lattobacilli presenti nello yogurt e nelle bevande a base di latte fermentato potevano essere in grado di apportare benefici per la salute umana.

Egli fu colpito dalla straordinaria longevità dei pastori bulgari e caucasici, che per tradizione consumavano grandi quantità di latte fermentato a cui il "padre dell'immunità naturale" attribuì il merito della eccezionale sopravvivenza osservata in quelle popolazioni.

Metchnikoff nel 1907 sostenne che la dipendenza dei microbi intestinali dal cibo rendesse plausibile l'adozione di misure volte a modificare la flora presente nel corpo umano, per sostituire i microbi dannosi con quelli utili.

Da allora molte ricerche sono state condotte in questo campo portando a quello che oggi noi conosciamo come "probiotici". Per definizione, sono probiotici quei microrganismi non patogeni (batteri o lieviti) del microbiota che, se somministrati per via orale, possono replicarsi e colonizzare, senza effetti dannosi, il tratto gastrointestinale in numero sufficiente per determinare effetti benefici per l'ospite.

**Un probiotico, dunque, deve essere di origine umana, resistere all'acidità dello stomaco e all'azione della bile, so-**

**pravvivere nel tratto gastrointestinale e aderire alla mucosa riproducendosi, essere perfettamente tollerabile e avere effetti benefici per la salute** antagonizzando i microrganismi patogeni e producendo sostanze antimicrobiche.

Le linee guida sui probiotici emanate dal ministero della Salute hanno modificato **la definizione di probiotico in “Microrganismi vivi e vitali che conferiscono benefici alla salute dell’ospite quando consumati, in adeguate quantità, come parte di un alimento o di un integratore”** (Ministero Salute, 2013).

Perché venga attribuito lo status di probiotico sia l’OMS sia il ministero della Salute fanno riferimento allo stato di vitalità al momento dell’uso, alla concentrazione e alla funzionalità dei microrganismi.

Secondo le linee guida, **la quantità sufficiente per ottenere una temporanea colonizzazione dell’intestino da parte di un ceppo di probiotico deve essere di almeno 10<sup>9</sup> cellule vive**. Tale quantità di cellule deve essere presente nella quantità di assunzione giornaliera dell’alimento/integratore per almeno un ceppo fra quelli presenti nel prodotto.

I probiotici devono essere considerati sicuri per l’impiego nell’essere umano. L’accertamento della posizione tassonomica è volto a garantire la sicurezza del microorganismo usato, perché consente di riconoscere la specie batterica con una lunga storia di consumo sicuro.

L’uso di un nuovo ceppo microbico, sia pure appartenente a una specie già impiegata, richiede una nuova valutazione della sicurezza e dell’efficacia. Ai fini dell’accertamento della sicurezza si ribadisce la necessità di una identificazione tassonomica a livello di specie e di ceppo, così come la valutazione del profilo di antibiotico-resistenza (antibatteriche o antimicotiche a seconda dei casi).

Il profilo delle antibiotico-resistenze va determinato per ogni singolo ceppo microbico utilizzato, al fine di escludere la presenza di quelle acquisite e anche di quelle solo potenzialmente trasmissibili. Come eccezione, non si ritiene necessaria la valutazione della sicurezza per un ceppo che appartiene a specie sufficientemente caratterizzate.

**Le specie batteriche con caratteristiche probiotiche riconosciute secondo i criteri sopra esposti sono ancora molto poche e comprendono Lattobacilli, Bifidobatteri, Streptococchi, Escherichia coli, Lactococcus lactis e alcuni Enterococchi**, mentre il solo lievito probiotico usato attualmente è il *Saccharomyces Boulardii* (Gallo, 2106); peraltro l’evoluzione delle tecnologie che consentono di tipizzare e di manipolare geneticamente le specie microbiche consentiranno, in un prossimo futuro, di ampliarne la disponibilità.

**I probiotici esercitano in differenti modi un effetto di regolazione sulla barriera epiteliale.** Con un’azione diretta sull’epitelio intestinale, il probiotico aumenta la sintesi e la secrezione della mucina da parte delle cellule caliciformi; i batteri probiotici sono inoltre in grado di produrre diverse sostanze ad attività antimicrobica (batteriocine) e competono con gli agenti patogeni e commensali per le sedi di legame con le mucine e con le cellule epiteliali, impedendone la colonizzazione nociva e contribuendo alla funzione della barriera mucosa. Il probiotico migliora la stabilità delle TJ, con riduzione della permeabilità epiteliale agli agenti patogeni e ai loro prodotti e determina

una modulazione dell’espressione di geni che codificano per citochine antinfiammatorie.

I probiotici esercitano effetti positivi sull’immunità mucosale aumentando la proliferazione di linfociti B secerenti IgA nella lamina propria e promuovendo la secrezione di IgA nello strato mucoso endoluminale. Inoltre, il probiotico può alterare la composizione e l’espressione genica a livello del microbiota, con potenziamento indiretto della barriera attraverso i batteri commensali.

**I probiotici rappresentano un approccio terapeutico-nutrizionale sicuro, esente da effetti collaterali negativi a lungo termine e di provata efficacia nel trattamento di malattie immunologiche, digestive e respiratorie.**

Va tuttavia ricordato che ceppi specifici di *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* non sono ugualmente efficaci nel trattamento della stessa patologia e che ciascuno di essi può avere diversi meccanismi di azione. La somministrazione di probiotici contenenti Bifidobatteri si associa a un miglioramento della barriera epiteliale e a una riduzione della traslocazione batterica, dell’infiammazione intestinale e dell’endotossiemia metabolica. Alcuni ceppi di Lattobacilli, soprattutto quelli produttori di acido linoleico coniugato, contribuiscono a un calo ponderale, alla riduzione del volume degli adipociti e della massa del tessuto adiposo e a migliorare la tolleranza al glucosio, modulando l’espressione di leptina e la sintesi di acidi grassi (Festi D et al., 2014). È stato osservato che ceppi di Lattobacilli promuovono un miglioramento della funzionalità immunitaria intestinale e modulano il profilo lipidico plasmatico attraverso la stimolazione dell’ossidazione degli acidi grassi e l’inibizione dell’attività della lipoprotein lipasi (Festi D et al., 2014).

La somministrazione di probiotici che uniscono ceppi di Bifidobatteri e Lattobacilli migliora significativamente la tolleranza al glucosio e riducono l’assunzione di cibo, aumentando la produzione di SCFA e butirato in particolare, che stimolano la produzione intestinale di GLP-1.

Inoltre probiotici contenenti ceppi di Lattobacilli modificano la composizione del microbiota intestinale, promuovendo l’espansione della popolazione di Bifidobatteri dell’ospite, migliorando così le funzioni metaboliche e riducendo l’attività pro-infiammatoria.

#### **Effetti dei probiotici nelle condizioni patologiche**

Gli effetti benefici della supplementazione con probiotici in diverse patologie sono evidenziati da un’ampia letteratura, anche se la valutazione dell’efficacia è resa complessa dall’esistenza di studi condotti con ceppi singoli o multipli molto diversi tra loro, e con metodologie non sempre confrontabili. Nel caso della stipsi, patologia che interessa un terzo della popolazione femminile, studi condotti con probiotici ben caratterizzati e definiti in gruppi di soggetti numerosi forniscono dati positivi di efficacia. Ad esempio, il trattamento per 30 giorni con *Lactobacillus plantarum* LP01 in associazione con *Bifidobacterium breve* BR03 oppure soltanto con *Bifidobacterium animalis* è risultato associato al miglioramento della sintomatologia generale in 300 volontari (Del Piano et al., 2010). Dati robusti sono stati dimostrati a favore dell’effetto protettivo dei probiotici nella prevenzione della diarrea da *C. difficile*,

che spesso, come prima ricordato, si osserva in corso di terapia antibiotica e in pazienti anziani ospedalizzati (Goldenberg et al., 2013). In questi ultimi il rischio si ridurrebbe del 50% quando la somministrazione di probiotici è ravvicinata alla prima somministrazione dell'antibiotico (Shen et al., 2017).

Una review sistematica e metanalisi della letteratura ha mostrato un'efficacia significativa di una miscela di probiotici contenenti *B. lactis* e Lattobacilli nel controllo della sintomatologia legata a disturbi gastrointestinali (dispepsia, dolori addominali, gonfiore e flatulenza) in soggetti che non assumevano alcuna terapia al riguardo (Eales, 2017).

Per quanto riguarda le malattie intestinali su base infiammatoria, i dati della letteratura sono a favore di un effetto protettivo dei probiotici nella colite ulcerosa, anche in associazione con prebiotici, piuttosto che nella malattia di Crohn (Martinez et al., 2015, Gallo et al., 2016).

Diverse evidenze dimostrano la capacità di modulare positivamente la risposta immunitaria contro le infezioni invernali specialmente in soggetti in età avanzata (Mello et al., 2016).

L'efficacia di specifici ceppi di probiotici nella protezione delle vie aeree superiori è stata testata, ad esempio, in studenti di college, nei quali la supplementazione con *L. rhamnosus* LGG e *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 per 12 settimane ha ridotto la durata degli episodi di infezioni delle vie aeree superiori e di conseguenza il numero di giorni di assenza per malattia, migliorando complessivamente la qualità della vita (Smith et al., 2013).

Un lavoro di Nocerino et al. ha dimostrato che il latte vaccino e il riso fermentati con *Lactobacillus paracasei* di ceppo CBA L74 somministrati in un gruppo di 377 bambini sani di età compresa tra 1 e 4 anni, riducevano significativamente, rispetto al placebo, il numero di infezioni delle vie respiratorie superiori e di gastroenteriti acute, e inoltre riducevano significativamente anche il ricorso ad antibiotici e il numero di visite pediatriche (Nocerino, 2017).

Una revisione Cochrane, pur rilevando i limiti degli studi analizzati, conclude che i probiotici sono superiori rispetto al placebo anche nel ridurre la necessità di intervenire con antibiotici sia negli adulti e sia nei bambini, in assenza di effetti indesiderati (Hao et al., 2015).

Va sottolineato che le linee guida dell'organizzazione mondiale di allergologia includono l'uso di probiotici per la prevenzione primaria dell'eczema sia nei bambini a rischio, sia per le mamme di bambini che hanno un rischio elevato di sviluppare allergia, in gravidanza e durante l'allattamento (Forsberg et al., 2016). Anche un documento di consenso delle Società italiane di pediatria e di allergologia pediatrica evidenzia l'effetto favorevole dei probiotici nella dermatite atopica e sottolinea che, benché i dati siano ancora insufficienti per supportare gli effetti positivi dei probiotici nei confronti di asma, rinite e malattie allergiche, ciò non implica necessariamente che interventi di questa natura non possano essere raccomandati (di Mauro et al., 2016).

L'utilizzo dei probiotici è stato proposto anche come strategia terapeutica per le malattie cutanee su base immunitaria (Bowe, 2013), nella prevenzione e nel trattamento delle infezioni urogenitali femminili (Hanson et al., 2016) e in odontoi-

tria nelle infezioni del cavo orale (Pujia et al., 2017).

Nel campo delle patologie metaboliche e cardiovascolari, una metanalisi di 11 trial clinici randomizzati ha evidenziato un effetto significativo di riduzione della colesterolemia totale (-6,4 mg/dL) e LDL (-4,9 mg/dL), in assenza di variazioni della colesterolemia HDL, in soggetti supplementati per 4-8 settimane con diversi probiotici (Guo et al., 2011).

Un'altra metanalisi ha evidenziato come gli effetti ipocolesterolemizzanti dei probiotici siano più marcati nei soggetti con livelli di colesterolemia moderatamente elevati rispetto a quanto si osserva nei soggetti con livelli nella norma. Gli Autori, confrontando i diversi ceppi utilizzati negli studi disponibili, hanno concluso che il *Lactobacillus reuteri* NCIMB sembra essere il ceppo con maggiore efficacia sul profilo lipidemico (Shimizu et al., 2015).

Una più recente revisione sistematica della letteratura, che ha incluso un numero maggiore di studi clinici e di ceppi di probiotici impiegati, ha messo in luce l'effetto ipocolesterolemizzante, non solo del *Lactobacillus reuteri*, ma anche del *L. plantarum* (Wu et al., 2017).

I probiotici hanno dimostrato un'efficacia anche sul controllo glicemico di soggetti con diabete di tipo 2 (Li et al., 2016) e sulla resistenza insulinica in donne con diagnosi di diabete gestazionale (Taylor et al., 2016).

In donne in post-menopausa, la supplementazione con *L. plantarum* per 90 giorni si è associata a una riduzione significativa della colesterolemia LDL, della glicemia e dei livelli di omocisteina; inoltre è stata registrata una riduzione di infiammazione sistemica, valutata come diminuzione delle concentrazioni plasmatiche di IL 6 (Barreto et al., 2014).

Supplementazioni con specie diverse di Lattobacilli, soprattutto se in associazione tra loro, hanno prodotto riduzioni moderate, tuttavia significative, della pressione sistolica in soggetti ipertesi (Khalesi et al., 2014).

Un'area particolarmente interessante riguarda l'impiego di probiotici in patologie del SNC (v. anche capitolo 2). Una metanalisi di 7 studi clinici randomizzati e controllati ha messo in luce un effetto positivo del consumo di probiotici sull'evoluzione di sintomi preclinici di depressione, ansia e stress in volontari sani, confermando i risultati ottenuti in modelli animali e nell'uomo, a supporto dei benefici per la salute psichica di alcuni ceppi, soprattutto Lattobacilli e Bifidobatteri, spesso somministrati in combinazione (Mc Kean et al., 2016). Un'altra review sistematica su 10 studi randomizzati e controllati condotti con singoli ceppi o con cocktail di Lattobacilli e Bifidobatteri ha documentato un effetto dei probiotici nel controllo di ansia e depressione (Pirbaglou et al., 2016).

Alcuni gruppi di ricerca hanno evidenziato una correlazione tra tono dell'umore e sindrome dell'intestino irritabile, a conferma del fatto che i benefici dei probiotici a livello intestinale si riverberano anche a livello psicologico (Sarkar et al., 2016).

Altro ambito di utilizzo dei probiotici sotto i riflettori della ricerca è quello relativo alle patologie muscoloscheletriche. Sono state chiaramente messe in evidenza le relazioni tra

fattori di rischio per osteoporosi o fragilità ossea e alterazioni del microbiota (Hernandez et al., 2016). In un modello animale di osteoartrite, la somministrazione orale di *Lactobacillus casei* da solo o insieme a collagene di tipo 2 e glucosamina (potenziale prebiotico) ha dimostrato effetto sinergico nella riduzione del dolore, della distruzione della cartilagine e dell'infiltrazione dei linfociti (Steves et al., 2016).

Alcuni ceppi di batteri si oppongono alla perdita di massa ossea come dimostrato in un modello sperimentale meno-pausale di femmine di topo ovariectomizzate supplementate con *Lactobacillus reuteri* (Britton et al., 2016).

In anziani con frattura del radio distale, il recupero è stato più rapido in termini di sintomatologia e forza articolare, con la somministrazione di *Lactobacillus casei Shirota* per quattro mesi (nessuna differenza è stata poi osservata a sei mesi tra il gruppo trattato e quello di controllo) (Lei et al., 2016).

### Microincapsulazione: nuova metodica di preparazione dei probiotici

I probiotici, per esercitare i loro positivi effetti sulla salute umana, devono raggiungere e colonizzare l'intestino, il che significa che devono passare attraverso un ambiente particolarmente ostico rappresentato dallo stomaco e dal duodeno. Questo passaggio inevitabilmente riduce drasticamente il numero di cellule vitali che riescono a raggiungere il colon. La capacità di resistere ai succhi gastrici e duodenali è fortemente ceppo-dipendente, tuttavia **in media solo il 15-25% dei microrganismi probiotici in formulazioni tradizionali può raggiungere l'intestino in forma vitale**. I probiotici vengono prevalentemente inattivati dal succo gastrico, mentre sali biliari e secrezioni pancreatiche determinano il 35-40% della mortalità dei microrganismi che sono sopravvissuti al transito attraverso lo stomaco.

È possibile valutare la resistenza dei ceppi probiotici in vitro utilizzando succhi e secrezioni reali umane o simulate. Del Piano et al., hanno valutato la resistenza di sette ceppi di *L. plantarum* sia a succo gastrico simulato sia a succo gastrico reale prelevato da soggetti sani a digiuno (Del Piano et al., 2006). È stato notato che meno del 20% dei batteri sopravviveva dopo un'ora di esposizione al succo gastrico simulato, mentre il succo gastrico umano consentiva la sopravvivenza con percentuali oscillanti tra il 15 e il 45%. Per quanto riguarda i sali biliari, i batteri sono meno sensibili a quelli di derivazione umana che a quelli di derivazione bovina (Del Piano et al., 2006), mentre la sensibilità dei probiotici al succo pancreatico umano e a quello simulato risulta simile (Del Piano et al., 2008).

Alcune strategie possono essere utilizzate per migliorare significativamente l'efficienza dei probiotici. Una di queste è **la microincapsulazione dei batteri all'interno di un involucro costituito da materiale gastroresistente**. Il rivestimento protettivo **consente all'ingrediente funzionale (in questo caso le cellule probiotiche) di rimanere separato dall'ambiente fino al rilascio nel punto desiderato, cioè a valle dello stomaco per i probiotici**.

**La microincapsulazione** offre un altro rilevante vantaggio rispetto alle formulazioni tradizionali: la nuova metodica **permette di utilizzare concentrazioni batteriche di un quinto**

### inferiori a quella delle formulazioni non microincapsulate per ottenere gli stessi benefici.

È possibile realizzare la microincapsulazione di probiotici utilizzando rivestimenti polisaccaridici o lipidici. Del Piano et al. hanno condotto uno studio randomizzato, in doppio cieco e con cross-over tra i due bracci di trattamento di comparazione sul tempo di colonizzazione degli stessi ceppi probiotici in formulazione tradizionale o microincapsulata mediante involucro lipidico (Del Piano et al., 2011). Sono stati inclusi nello studio 44 soggetti sani, suddivisi in due gruppi: il primo (n=21) ha ricevuto una miscela probiotica contenente i ceppi *L. plantarum* LP01 (LMG P-21021) e *B. breve* BR03 (DSM 16604) in formulazione tradizionale; l'altro gruppo (n=23) ha ricevuto la stessa miscela di probiotici, microincapsulati con involucro gastroresistente. È stato effettuato un periodo di *wash-out* di 3 settimane alla fine del primo periodo di trattamento in modo da procedere a un cross-over tra i due gruppi, che così hanno ricevuto entrambe le formulazioni per lo stesso periodo.

Per entrambi i periodi di trattamento il rapporto tra numero di cellule vitali dei ceppi non rivestiti e il numero dei batteri microincapsulati è sempre stato di 5:1 (10 miliardi CFU per i ceppi non rivestiti : 2 miliardi CFU per i ceppi microincapsulati). Gli aumenti statisticamente significativi di *Lactobacilli* e *Bifidobatteri*, nelle feci di entrambi i gruppi alla fine di ogni periodo di trattamento, si sono verificati con cinetiche di colonizzazione simili tra i batteri microincapsulati e quelli non rivestiti somministrati in quantità cinque volte superiore. È stata osservata una tendenza a una migliore, seppur non statisticamente significativa, cinetica di colonizzazione da parte dei batteri microincapsulati (Tab. I).

La sopravvivenza dei ceppi di *L. plantarum* LP01 e *B. breve* BR03 durante il transito gastro-duodenale è stata accertata mediante test con succo gastrico e sali biliari di provenienza umana, mentre per la secrezione pancreatică è stata impiegata una soluzione simulata. È stato documentato che solo il 15-25% del numero di cellule ingerite era in grado di raggiungere l'intestino se i ceppi non erano rivestiti. Nel caso della formulazione microincapsulata, la quasi totalità (oltre il 90%) delle cellule probiotiche ha superato indenne lo stomaco e il duodeno, poiché il materiale gastroresistente inizia a dissolversi solo nell'intestino in cui il pH è alcalino.

**La microincapsulazione dei ceppi probiotici con un involucro gastroresistente non soltanto assicura la sopravvivenza dei ceppi batterici, ma migliora anche la stabilità nel tempo del prodotto in differenti matrici**, un aspetto particolarmente rilevante se il contenuto acquoso del prodotto è elevato.

Sulla base di questi risultati, il gruppo di Del Piano ha condotto un altro studio, con uguale disegno (doppio, cieco, randomizzato e cross-over tra i bracci di trattamento), in cui è stata utilizzata in 53 soggetti una miscela composta da cinque diversi ceppi probiotici [*L. acidophilus* LA02 (DSM 21717), *L. rhamnosus* LR04 (DSM 16605), *L. rhamnosus* GG, or LGG (ATCC 53103), *L. rhamnosus* LR06 (DSM 21981), e *B. lactis* BS01 (LMG P-21384)], in formulazione tradizionale (n = 26) o microincapsulata (n = 27) (Del Piano et al., 2012).

I ceppi in forma tradizionale sono stati somministrati in quan-

**Tabella I.**

Quantificazione dei Lattobacilli e dei Bifidobatteri fecali ( $m \pm SEM$ ,  $\log_{10}$  CFU/g) prima e dopo i due periodi di trattamento, inclusa la fase di wash-out. Gruppo A: batteri non rivestiti; gruppo B: batteri microincapsulati.

Tempo	Gruppo A $\log$ CFU/g	p*	Gruppo B $\log$ UFC/g	p*	p** (A vs B)
$d_0$					
Lactobacilli	$5.53 \pm 0.23$	***	$5.47 \pm 0.20$	***	0,85
Bifidobacteria	$7.94 \pm 0.23$	***	$8.25 \pm 0.19$	***	0,29
$d_{10}$					
Lactobacilli	$6.89 \pm 0.12$	< 0.0001	$6.87 \pm 0.19$	< 0.0001	0,92
Bifidobacteria	$9.26 \pm 0.13$	0.0001	$9.21 \pm 0.17$	0.0008	0,83
$d_{21}$					
Lactobacilli	$7.32 \pm 0.13$	< 0.0001	$7.10 \pm 0.14$	< 0.0001	0,26
Bifidobacteria	$9.47 \pm 0.10$	< 0.0001	$9.43 \pm 0.12$	< 0.0001	0,81
$d_{42}$					
Lactobacilli	$5.61 \pm 0.23$	***	$5.75 \pm 0.21$	***	0,53
Bifidobacteria	$8.05 \pm 0.23$	***	$8.44 \pm 0.17$	***	0,34
$d_{52}$					
Lactobacilli	$7.13 \pm 0.14$	< 0.0001	$6.96 \pm 0.15$	< 0.0001	0,41
Bifidobacteria	$9.38 \pm 0.09$	0.0001	$9.19 \pm 0.16$	0.003	0,30
$d_{63}$					
Lactobacilli	$7.41 \pm 0.13$	< 0.0001	$7.20 \pm 0.13$	< 0.0001	0,27
Bifidobacteria	$9.63 \pm 0.08$	< 0.0001	$9.47 \pm 0.08$	< 0.0001	0,18

UFC: indica unità formanti colonie. \*\*\* Tempo di riferimento di confronto ( $d_0$  per il 1° periodo di trattamento e  $d_{42}$  per il 2°). \*\* Confronto tra i due gruppi in  $d_0$  e analisi successiva.

\* Confronto tra tempo zero ( $d_0$ ) o  $d_{42}$  e la seguente analisi all'interno di ciascun gruppo.

tità pari a  $5 \times 10^9$  CFU/die/ceppo (totale  $25 \times 10^9$ /die) per 21 giorni, mentre i batteri microincapsulati sono stati somministrati in quantità di  $1 \times 10^9$  CFU/die/ceppo (totale  $5 \times 10^9$  CFU/die) per 21 giorni. Alla fine di questo periodo è stata condotta una fase di wash-out di 3 settimane dopo la quale sono stati incrociati i gruppi rispettando gli stessi schemi posologici del primo periodo di trattamento.

È stata effettuata una valutazione quantitativa della colonizzazione intestinale da parte dei probiotici, microincapsulati e in formulazione standard, analizzando campioni fecali al basale (tempo 0) dopo 10 e 21 giorni di ogni periodo di trattamento. A ogni check-point sono stati quantificati i Lattobacilli fecali totali, i Lattobacilli eterofermentativi e i Bifidobatteri totali.

Gli autori hanno riscontrato un aumento significativo nelle quantità di Lattobacilli totali, di Lattobacilli eterofermentativi e di Bifidobatteri totali in entrambi i gruppi, alla fine di ogni periodo di supplementazione rispetto a  $T_0$  e a  $T_{42}$  (fine fase di wash out), confermando così la capacità di ogni ceppo, nella composizione somministrata, di colonizzare l'intestino sia in formulazione tradizionale sia in formulazione gastroprotetta. Nei soggetti che hanno ricevuto i probiotici microincapsulati è stata dimostrata una cinetica di colonizzazione del tutto sovrapponibile a quella dei soggetti trattati con formulazione tradizionale ma con una quantità di batteri 5 volte inferiore.

Questo studio in cui sono stati impiegati 5 diversi ceppi batterici rafforza, quindi, ulteriormente la possibilità della microincapsulazione di utilizzare un numero grandemente inferiore di cellule probiotiche per ottenere uguali effetti.

### **Lactobacillus plantarum LP01**

#### **Diversità genomica e versatilità**

I Lattobacilli fanno parte della famiglia dei batteri lattici e ricavano quasi tutta la loro energia dalla fermentazione del glucosio e del lattosio ad acido lattico (fermentazione omolattica). Il loro metabolismo genera ATP da fosforilazione non-ossidativa del substrato. Alcuni batteri appartenenti al genere Lactobacillus sono in grado di produrre, attraverso il loro metabolismo, piccoli quantitativi di  $H_2O_2$ . Per le caratteristiche della loro parete rientrano nella classe dei batteri gram-positivi. Si tratta di batteri anaerobi facoltativi, asporogeni che hanno dimensioni cellulari di  $0,7-1,1 \mu m$  per  $2,0-4,0 \mu m$  e che non sono dotati di motilità. Presentano solamente forma bastoncellare, anche se possono assumere una conformazione a spirale o cocco bacillare in determinate circostanze. La classificazione tassonomica di questo genere batterico è: *Bacteria*, *Firmicutes*, *Bacilli*, *Lactobacillales*, *Lactobacilaceae*, *Lactobacillus*. Il ciclo replicativo varia da 25 minuti a 3-4 ore e si sviluppano in maniera

ottimale tra i 30 e i 40°C, i ceppi termofili possono resistere a temperature più alte (fino a 45°C). Sono associati comunemente con il tratto gastrointestinale degli animali e dell'uomo.

Si conoscono oltre 140 specie diverse di Lattobacilli, che, nella maggior parte dei casi, sono specializzate e si ritrovano in un numero limitato di nicchie. **Tra le varie specie di Lattobacilli, *L. plantarum* si contraddistingue per la sua versatilità dimostrata dal fatto che questo microrganismo si ritrova in molte nicchie ecologiche come vegetali, carne, pesce e prodotti caseari oltre che nel tratto gastrointestinale di uomini e animali.**

Come altri lattobacilli, *L. plantarum* cresce a temperature comprese tra 15°C e 45°C, ma ha la capacità di resistere e svilupparsi anche in ambienti acidi fino a valori di pH di 3,2.

*L. plantarum* è un microrganismo eterofermentativo in grado di fermentare zuccheri per produrre acido lattico, etanolo, acido acetico e diossido di carbonio. *L. plantarum* ha tuttavia la capacità di passare da un metabolismo eterofermentativo a uno omofermentativo in base alla disponibilità di fonti di carbonio (Siezen et al., 2011).

Questo microrganismo è ampiamente utilizzato nell'industria alimentare, dove trova il maggior impiego nei preparati vegetali come crauti, olive in salamoia, cetrioli in salamoia. Viene anche usato per le preparazioni di alcune paste madri per la produzione di pane, in alcuni formaggi, in insaccati fermentati e nella stagionatura dello stoccafisso. *L. plantarum* è anche uno dei batteri maggiormente usati come inoculo negli insilati, dove, in condizioni di anaerobiosi, acidifica il substrato in maniera ottimale tramite la produzione di acido lattico e acido acetico. In questa fase inoltre produce anche molte proteine che vengono poi ritrovate nel prodotto finale.

**La versatilità di questo microrganismo è legata alle sue caratteristiche genetiche.** Il genoma di *L. plantarum* consiste di un cromosoma circolare di 3,3 Mb che rappresenta la più ampia sequenza genomica fra tutti i batteri produttori di acido lattico (Kleerebezem et al., 2003).

*L. plantarum* può crescere in presenza o in assenza di ossigeno. Il corredo enzimatico consente a questo particolare lattobacillo di attuare una fermentazione omolattica o eterolattica, utilizzando diverse fonti di carbonio, grazie a un trasferimento genico orizzontale.

In condizioni aerobiche, il batterio oltre all'acetato, produce come sottoprodotto metabolico perossido di idrogeno ad attività battericida verso altri microrganismi.

***L. plantarum* è in grado di adattarsi alle situazioni ambientali più diverse e ostili come quelle che si riscontrano a livello gastrico e duodenale, con bassi valori di pH ed elevato contenuto di sali biliari.** Il suo genoma consente a questo batterio di produrre proteasi che degradano proteine anormali o non funzionanti e proteine da shock in modo da risparmiare energia in condizioni di stress e sopravvivere ai diversi contesti ambientali. **Grazie al corredo di catalasi, perossidasi e reduttasi, *L. plantarum* esercita un'azione di scavenger verso i radicali liberi in condizioni di stress ossidativo.**

Oltre a essere in grado di adattarsi alle diverse condizioni ambientali, *L. plantarum* modifica le proteine di superficie in modo da interagire con diversi substrati e potere crescere. In

particolare il lattobacillo possiede una capacità di adesione mannoso-specifica che gli permette di aderire all'epitelio intestinale, entrando così in competizione per i nutrienti con batteri patogeni gram-positivi e negativi. Questa caratteristica oltre alla sua capacità di adattarsi a condizioni di pH e temperatura sfavorevoli, fa di *L. plantarum* un probiotico utile in diverse condizioni patologiche.

È stato riscontrato che *L. plantarum* è in grado di sopprimere la risposta infiammatoria delle cellule epiteliali intestinali inibendo l'attivazione di TNF- $\alpha$  e quindi riducendo il signaling dell'IL-8, potente citochina infiammatoria (Ko et al., 2007).

**Inoltre è stato osservato che questo batterio esercita un effetto protettivo sulle TJ** (Zhang et al., 2010).

Questi risultati indicano che ***L. plantarum* come probiotico può mantenere l'integrità della barriera intestinale, riducendo la permeabilità e il livello di proteine pro-infiammatorie nel tratto gastrointestinale.**

La capacità di *L. plantarum* di sopravvivere in ambiente acido è stata alla base di studi che hanno dimostrato la sua utilità per contrastare patogeni presenti a livello gastrico, come *Helicobacter pylori* responsabile di gastriti e ulcere. Il lipopolisaccaride e le proteine di superficie di *H. pylori* stimolano la produzione di TNF- $\alpha$ , interleuchine e specie reattive dell'ossigeno. Questi composti dannosi non restano localizzati nel sito di infezione ma possono diffondersi nell'organismo amplificando i danni.

Gli utilizzatori cronici di farmaci inibitori di pompa protonica (PPI), come i soggetti anziani, presentano una ridotta acidità gastrica (pH: 5-6) che vanifica l'effetto barriera protettivo presente in uno stato fisiologico (pH: 1-2) con conseguente sopravvivenza e proliferazione di batteri patogeni sia nello stomaco che nell'intestino. L'utilizzo di specifici batteri probiotici, capaci di colonizzare lo stomaco, ripristina l'effetto barriera impedendo la crescita di potenziali patogeni, prevenendo e contrastando il dismicoibismo intestinale (Del Piano, 2012). È stato evidenziato che *L. plantarum* esplica un'attività anti *H. pylori* e può inibire la crescita di questo patogeno in ambiente acido (fino a pH 4). (Sunanliganon et al., 2012).

*L. plantarum* è quindi un batterio estremamente versatile, in grado di adattarsi a differenti condizioni ambientali, grazie alla sua capacità di fermentare diversi tipi di carboidrati e zuccheri. Alla luce di queste sue peculiarità, **questo lattobacillo può aiutare il ripristino dell'omeostasi del microbiota intestinale, limitando la presenza di batteri patogeni e risultando pertanto benefico alla salute umana.**

#### **Effetto sul sistema immunitario e implicazioni sistemiche**

Le proprietà immunomodulanti del ceppo batterico *L. plantarum* LP01 (LMG P-21021) sono state valutate in un'analisi in vitro condotta presso i laboratori Biolab Research - Gruppo Mofin Alce, sulle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di donatori adulti sani dopo tempi differenti di stimolazione, in modo da poter analizzare sia le cellule coinvolte nell'immunità innata sia quelle responsabili dell'immunità acquisita.

L'analisi in vitro della proliferazione cellulare è un parametro biologico molto utile quando si vuole studiare il funzionamento

del sistema immunitario. Allo scopo di analizzare se il ceppo batterico in esame potesse avere un effetto sull'induzione della proliferazione linfocitaria, PBMC sono state stimolate con il ceppo LP01. La fitoemoagglutinina (PHA), uno stimolo mitogeno capace di indurre la proliferazione polyclonale dei linfociti T, è stato utilizzato come controllo positivo.

Le PBMC sono state separate da campioni di sangue venoso periferico di 10 donatori sani maschi, di età media 42 anni (range 20-62 anni).

Dopo la separazione, le PBMC sono state stimolate con il ceppo batterico per 1 e 5 giorni.

La proliferazione cellulare è stata valutata con tecnica citofluorimetrica, utilizzando il protocollo di marcatura nucleare con bromodeossiuridina (BrdU).

I risultati sono stati espressi come indice di proliferazione cellulare (P.I.), calcolato come il rapporto tra la percentuale di cellule proliferanti in presenza dello stimolo e la percentuale delle stesse in assenza di stimolazione. Un valore di P.I. > 2 è stato considerato accettabile (valore soglia).

Per la caratterizzazione immunofenotipica, le cellule sono state incubate per 30 minuti al buio con differenti combinazioni di anticorpi monoclonali (mAb) CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56, HLA-DR.

#### Effetti del ceppo batterico *L. plantarum* LP01 sulle differenti sottopopolazioni cellulari

La risposta proliferativa delle PBMC in tutte le condizioni di stimolazione è risultata significativamente più elevata rispetto a quella in assenza di stimolazione (basale) (Fig. 10).

Allo scopo di determinare quali fossero le sottopopolazioni cellulari indotte a proliferare in seguito alla stimolazione con il ceppo probiotico in studio, è stata effettuata un'analisi di citometria a flusso multiparametrica.

#### Immunità naturale

Dopo un giorno, la stimolazione con il ceppo LP 01 ha determinato:

- un lieve aumento della percentuale dei monociti circolanti (CD14+);
- nessuna variazione nella percentuale delle cellule dendritiche totali (Lineage-/HLA-DR+);
- un lieve aumento della sottopopolazione delle cellule *Natural Killer* (CD16+/CD56+).

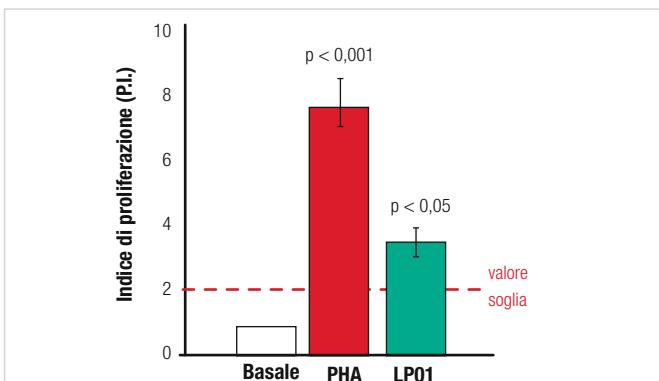
#### Immunità acquisita

Dopo 5 giorni, la stimolazione con il ceppo LP 01 ha determinato:

- un significativo aumento della percentuale di linfociti T helper (CD3+/CD4+);
- nessun effetto sulla percentuale dei linfociti T citotossici (CD3+/CD8+);
- un significativo aumento dei linfociti B totali circolanti (CD19+/CD20+) (Fig. 11).

#### Profilo citochinico

I linfociti T sono le principali cellule effettive e regolatrici dell'immunità cellulo-mediata. In risposta a un antigene o a un agente patogeno, le cellule T sintetizzano e secernono una varietà di citochine che servono per la crescita, il differen-



**Figura 10.**

Risposta proliferativa. Media ± errore standard della media (S.E.M.) di 10 esperimenti indipendenti. La significatività statistica è stata calcolata utilizzando il test t di Student. Valori di  $p < 0,05$ , calcolati rispetto al basale (PBMC non stimolati), sono da considerare statisticamente significativi.

ziamento e come fattori di attivazione per le altre cellule immunocompetenti. Il diverso spettro di citochine secrete dalle sottopopolazioni cellulari coinvolte, nelle risposte immunitarie, gioca un ruolo importante nella scelta del tipo di sistema effettore che deve essere utilizzato in risposta a una particolare sollecitazione antigenica.

Allo scopo di indagare se il ceppo batterico inducesse una differente secrezione citochinica da parte delle PBMC, tali cellule sono state attivate per 1 e 5 giorni. La quantità di citochine, rilasciata nei surnatanti di coltura, è stata dosata tramite saggio ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*).

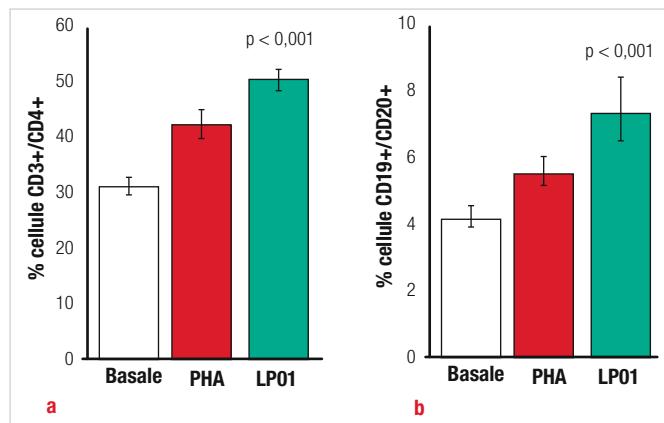
L'analisi ha mostrato che il ceppo batterico analizzato (LP01) è in grado di indurre, rispetto alle condizioni basali, un modesto aumento delle citochine pro-infiammatorie IL-12p70 e IFN- $\gamma$ .

***L. plantarum* LP01 è, tuttavia, in grado di indurre un aumento significativo delle citochine immunoregolatorie IL-4 e IL-10** rispetto al basale (Fig. 12).

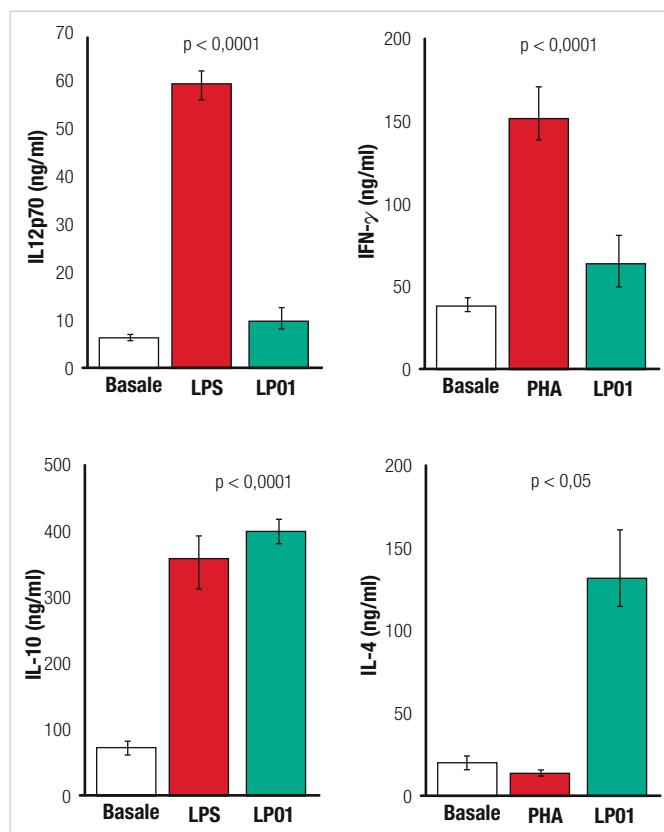
***L. plantarum* LP01 (LMG P-21021), si è dunque dimostrato in grado di modulare il sistema immunitario.** In particolare, il ceppo ha indotto la proliferazione delle PBMC. L'analisi delle differenti sottopopolazioni cellulari che compongono le PBMC, ha dimostrato variazioni soprattutto nelle percentuali delle cellule coinvolte nell'immunità specifica (linfociti T helper e linfociti B), rispetto alle condizioni basali di riferimento.

Nello specifico, è interessante osservare l'aumento significativo dei linfociti T helper, i principali effettori e regolatori dell'immunità cellulo-mediata. In seguito all'attivazione da parte di un antigene o un patogeno, tali cellule possono sintetizzare e secernere una varietà di citochine che servono come fattori di crescita, differenziamento e attivazione per le altre cellule immunocompetenti.

Sebbene l'analisi delle singole citochine secrete abbia dimostrato la capacità del ceppo batterico studiato di indurre un notevole aumento di tutte le citochine analizzate (IL-4, IL-10, IL-12p70 e IFN- $\gamma$ ), la valutazione del rapporto tra le citochine a prevalente azione pro-infiammatoria e quelle a prevalente

**Figura 11.**

Immunità acquisita. Media  $\pm$  SEM di 10 esperimenti indipendenti. *L. plantarum* LP01 ha indotto una proliferazione statisticamente significativa delle popolazioni di linfociti T helper (a) e linfociti B totali (b).

**Figura 12.**

Secrezione citochinica. La produzione delle citochine IL-12p70 e IL-10 è stata valutata nei surnatanti di coltura dopo 1 giorno di stimolazione. La produzione di IFN- $\gamma$  e IL-4 è stata valutata nei surnatanti di coltura dopo 5 giorni di stimolazione.

azione immunoregolatoria è stato determinante al fine di comprendere l'effettiva azione immunomodulante del ceppo batterico.

Il ceppo LP01 determinerebbe, infatti, un riequilibrio immunologico a favore delle risposte Th2 (anti-Th1).

La colonizzazione dell'intestino da parte dei batteri con specifiche proprietà pro-Th2, come il *L. plantarum* LP 01, potrebbe risultare utile nelle patologie caratterizzate da un profilo pronunciato di tipo Th1, quali le malattie autoimmuni (artrite reumatoide, sclerosi multipla, diabete mellito di tipo I, psoriasi) e le malattie infiammatorie dell'intestino (colite ulcerosa, morbo di Crohn). Queste malattie sono caratterizzate da un aumento dei livelli di citochine pro-infiammatorie quali IL-1, IL-12, IL-18 e IFN- $\gamma$ .

Diverse evidenze in letteratura sostengono l'impiego di probiotici in questa tipologia di malattie.

***L. plantarum* LP01 è un potente induttore della produzione di IL10, citochina ad attività antinfiammatoria.** L'IL10 è prodotta sia dalle cellule del sistema immunitario quali monociti attivati, cellule dendritiche e dai linfociti T (Th2), sia da altri stipit cellulari quali cheratinociti, epatociti, cellule epiteliali bronchiali. La citochina agisce sull'immunoregolazione con effetti pleiotropici: inibisce l'espressione di citochine Th1 e di molecole co-stimolatorie sui macrofagi; aumenta la sopravvivenza e la proliferazione dei linfociti B e, di conseguenza, la produzione di anticorpi; ha un effetto inibitorio sulla sintesi di citochine pro-infiammatorie e sull'attività di presentazione antigenica da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC).

## ***Lactobacillus buchneri* Lb26**

### **Internalizzazione di selenio e zinco**

Uno dei problemi emergenti che riguardano la salute umana in molte aree del pianeta è l'insufficiente introito di minerali in traccia e in particolare di selenio (Se) e zinco (Zn). Si stima che questa problematica interessi circa il 50% della popolazione mondiale.

Il problema più rilevante è individuare metodiche per veicolare più efficacemente questi micronutrienti nel corpo umano, essendo le forme inorganiche scarsamente assorbite.

**Il Se è un elemento in traccia necessario per la salute dell'uomo.** Negli organismi animali il Se viene assorbito in un range compreso tra il 50% e il 100% solo se supplementato in forma Se-Met.

Dopo assorbimento, il Se viene incorporato in proteine per formare le selenoproteine che sono importanti enzimi antiossidanti in grado di prevenire danni cellulari da radicali liberi e che intervengono nella regolazione della funzionalità tiroidea e del sistema immunitario.

**La carenza di Se, facilitata da disturbi gastrointestinali che ne riducono l'assorbimento, si associa ai danni dello stress ossidativo e contribuisce allo sviluppo di cardiopatie, ipotiroidismo e deficit del sistema immunitario.** Le quantità raccomandate da assumere giornalmente sono di 55 mcg per gli adulti, 60 mcg in gravidanza e 70 mcg durante allattamento.

Gli effetti del Se sono particolarmente importanti per contra-

stare i processi degenerativi legati all'invecchiamento, come la riduzione della funzionalità del sistema immunitario, stress ossidativo e disordini metabolici.

#### Lo Zn è un elemento importante per la crescita essendo coinvolto in numerosi aspetti del metabolismo cellulare.

Questo metallo è necessario per l'attività catalitica di circa 100 enzimi, gioca un ruolo nella **funzionalità del sistema immunitario**, ed è implicato nella sintesi del DNA e delle proteine e nella divisione cellulare. Lo Zn ha un ruolo importante sulle **funzioni cognitive** (de Moura et al., 2013; Warthon-Medina et al., 2015).

Un apporto giornaliero di Zn è indispensabile per mantenere uno stato stazionario dato che l'organismo umano non ha depositi di questo metallo. L'assorbimento dello Zn è proporzionale al suo apporto con l'alimentazione. Il tratto gastrointestinale mantiene l'omeostasi dello Zn aggiustando le perdite endogene del metallo in funzione della quantità assorbita.

#### Al fine di migliorare l'assorbimento di questi due preziosi micronutrienti, un'interessante nuova alternativa alle supplementazioni tradizionali è rappresentata dall'impiego di alcuni ceppi di probiotici arricchiti dei due minerali mediante un processo di internalizzazione.

In letteratura esistono tuttavia poche evidenze sulla capacità di alcuni ceppi batterici di internalizzare dei micronutrienti e trasferirli alle cellule umane e sulla biodisponibilità di questi elementi. Risulta pertanto particolarmente interessante uno studio di Mogna et al. condotto impiegando una coltura di cellule umane di colon della linea Caco-2, che mimano l'epitelio intestinale e che sono ampiamente utilizzate negli studi sul trasporto di nutrienti (Mogna et al., 2012). Le cellule sono state fatte crescere utilizzando un dispositivo di supporto (il sistema di Transwell) che crea un ambiente molto simile allo stato in vivo.

I ricercatori hanno così quantificato la biodisponibilità di alcune forme commerciali di Se e Zn confrontandola con quella delle forme organiche internalizzate da *L. buchneri* Lb26 (DSM 16341) e *B. lactis* Bb1 (DSM 17850).

I dati raccolti dimostrano che **l'internalizzazione di Se e Zn nei ceppi batterici selezionati aumenta significativamente la biodisponibilità dei due micronutrienti rispetto alle forme tradizionali (organiche e inorganiche)**. In particolare, il Se accumulato a livello intracellulare da *L. buchneri* Lb26 si è rivelato essere di 5,9, 9,4 e 65 volte più biodisponibile rispetto a selenio sodico, seleno-L-metionina e seleno-L-cisteina rispettivamente (Fig. 14).

È particolarmente interessante che Se e Zn internalizzati dai due probiotici sono state le uniche forme in grado di raggiungere il compartimento basolaterale del sistema di Transwell a una concentrazione più elevata di quella riscontrata a livello del compartimento apicale, quindi suggerendo una capacità in vivo considerevolmente maggiore di assorbimento a livello cellulare. Le forme organiche e inorganiche, al contrario, sono state prevalentemente riscontrate a livello del compartimento apicale, dimostrando una scarsa capacità di diffondere nella cellula e rendersi disponibili alle aree al di sotto delle cellule.

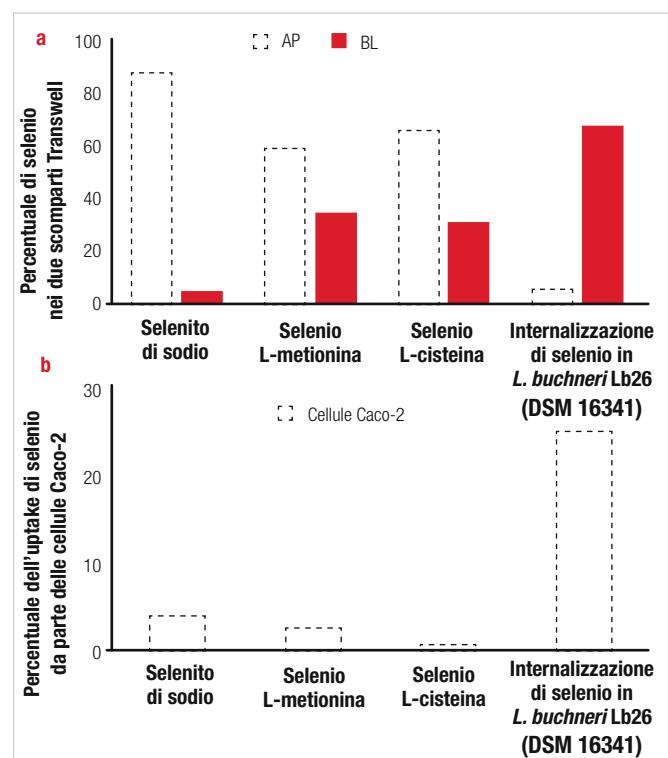
**Questo studio dimostra quindi la possibilità di veicolare minerali in forme altamente biodisponibili grazie a probio-**

**tici**, aprendo così la strada verso nuovi orizzonti nella supplementazione di micronutrienti.

#### *Bifidobacterium lactis* BS05

##### Azione antiossidante

Le specie reattive dell'ossigeno, generate dalla respirazione cellulare negli organismi aerobi, possono provocare danni alle proteine, mutazioni nel DNA, ossidazione dei fosfolipidi delle membrane cellulari e modificazioni delle lipoproteine a bassa densità. Questa serie di alterazioni può promuovere malattie croniche come l'aterosclerosi, diabete, patologie neurodegenerative, malattie cardiovascolari e tumori. Un approccio innovativo al riguardo è rappresentato dallo sviluppo di probiotici ad attività antiossidante, in grado di contrastare lo stress ossidativo nell'ospite. È stato osservato che alcuni ceppi di lattobacilli e bifidobatteri esercitano un'attività antiossidante. Tuttavia gli studi comparativi di queste caratteristiche sono lacunosi. È quindi particolarmente interessante lo studio di Amaretti et al. in cui sono state valutate le proprietà antiossidanti di 34 ceppi di lattobacilli e bifidobatteri, in un modello di stress ossidativo indotto sperimentalmente in ratti. Dall'analisi dei risultati è emerso che alla dose di  $10^8$  CFU/ml *B. animalis* subspecie *lactis* BS05 (DSMZ 23032), *L. acidophilus* DSMZ 23033 e *Lactobacillus brevis* DSMZ 23034 sono efficaci sia



**Figura 14.**

Assorbimento di selenio (Se) da parte delle cellule Caco-2 dopo esposizione per 24 ore a 1 mM di Se in soluzione. A: quantificazione di Se presente nel compartimento apicale (AP) e basolaterale (BL) del sistema di Transwell. B: quantificazione di Se presente in cellule umane differenziate Caco-2.

**Tabella II.**

Bifidobacterium lactis B505 (da Amaretti et al., 2013, mod.).

Ceppi	TGSH (nmol/mg)
<b>Bifidobacterium</b>	
<i>B. adolescentis</i> DSMZ 18351	0
<i>B. pseudocatenulatum</i> WC 0402	0
<i>B. pseudocatenulatum</i> WC 0408	0
<i>B. breve</i> WC 0421	5,8
<i>B. breve</i> WC 0424	0
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSMZ 23032	30,3
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> A TCC 15708	0
<b>Lactobacillus</b>	
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	0,2
<i>L. amylovorus</i> DSMZ 20552	0,1
<i>L. acidophilus</i> WC 0203	0,9
<i>L. acidophilus</i> DSMZ 23033	4,5
<i>L. brevis</i> DSMZ 23034	0
<i>L. coryniformis</i> ATCC 25600	0
<i>L. helveticus</i> S 40. 8	0
<i>L. plantarum</i> LN 3	1,3
<i>L. plantarum</i> LPI	2,7
<i>L. plantarum</i> MB 395	0
<i>L. reuteri</i> ATCC 23272	1,9

come antiossidanti diretti (poiché contrastano l'ossidazione dell'acido ascorbico e dell'acido linolenico) e sia indirettamente, perché aumentano la capacità antiossidante complessiva, riducendo lo stress ossidativo indotto da doxorubicina nel ratto (Amaretti et al., 2013).

In particolare ***B. lactis* BS05 è il ceppo batterico in grado di aumentare in modo nettamente più marcato rispetto agli altri ceppi i livelli intracellulari di glutatione ridotto (GSH)**, considerato l'antiossidante più importante presente nelle cellule.

Il lavoro di Amaretti et al. dimostra come **le proprietà antiossidanti siano caratteristiche specie-specifiche: alcuni ceppi sono infatti particolarmente ricchi di glutatione, SOD e sostanze chelanti i metalli e agiscono di concerto nel contrastare lo stress ossidativo** indotto sperimentalmente (Tab. II).

**Keypoints**

- Le possibilità attualmente disponibili per cercare di variare la composizione del microbiota intestinale sono rappresentate da modificazioni dello stile di vita, dall'uso di antibiotici, dal ricorso a probiotici e prebiotici fino al trapianto di microbiota.
- Per probiotici si intendono microrganismi vivi e vitali che conferiscono benefici alla salute dell'ospite quando consumati, in adeguate quantità, come parte di un alimento o di un integratore.
- I probiotici rappresentano un approccio terapeutico-nutrizionale sicuro, esente da effetti collaterali negativi a lungo termine e di provata efficacia nel trattamento di malattie immunologiche, digestive e respiratorie.
- Probiotici contenenti ceppi di Lattobacilli modificano la composizione del microbiota intestinale, promuovendo l'espansione della popolazione di Bifidobatteri dell'ospite, mi-

giorando così le funzioni metaboliche e riducendo l'attività pro-infiammatoria.

- In media solo il 15-25% dei microrganismi probiotici in formulazioni tradizionali può raggiungere l'intestino in forma vitale.
- La microincapsulazione dei batteri all'interno di un involucro costituito da materiale gastroresistente consente all'ingrediente funzionale di rimanere separato dall'ambiente fino al rilascio nel punto desiderato, cioè a valle dello stomaco per i probiotici.
- La microincapsulazione permette di utilizzare concentrazioni batteriche di un quinto inferiori a quella delle formulazioni tradizionali non microincapsulate per ottenere gli stessi benefici.
- Tra le 140 specie di Lattobacilli conosciute, *L. plantarum* si contraddistingue per la sua versatilità dimostrata dal fatto che questo microrganismo si ritrova in molte nicchie ecologiche come vegetali, carne, pesce e prodotti caseari oltre che nel tratto gastrointestinale di uomini e animali.
- L. plantarum* è in grado di adattarsi alle situazioni ambientali più diverse e ostili, come quelle che si riscontrano a livello gastrico e duodenale, con bassi valori di pH ed elevato contenuto di sali biliari.
- Grazie al corredo di catalasi, perossidasi e reduttasi, *L. plantarum* esercita un'azione di scavenger verso i radicali liberi in condizioni di stress ossidativo.
- L. plantarum* come probiotico può aiutare l'integrità della barriera intestinale, riducendo la permeabilità e il livello di proteine pro-infiammatorie nel tratto gastrointestinale e risultando pertanto benefico alla salute umana.
- L. plantarum* LP 01 (LMG P-21021), si è dimostrato in grado di modulare in senso positivo l'attività del sistema immunitario, promuovendo la proliferazione dei monociti del sangue periferico e stimolando la produzione di citochine antinfiammatorie come IL-10.
- L. buchneri* Lb26 aumenta significativamente la biodisponibilità di Selenio rispetto alle forme tradizionali (organiche e inorganiche).
- B. lactis* BS05 esercita una potente attività antiossidante aumentando in maniera significativa i livelli intracellulari di glutatione ridotto (GSH).

**PROXIAN®****Caratteristiche del prodotto**

Uno stato di funzionalità ottimale del sistema immunitario sia innato (non specifico o naturale) sia acquisito (specifico) è essenziale nella difesa contro l'invasione di patogeni. **La possibilità di impiegare ceppi probiotici per modulare l'attività del sistema immunitario riducendo la risposta infiammatoria e allertando la vigilanza immunitaria, è una opportunità particolarmente interessante sotto il profilo clinico.**

Gli effetti di preparazioni contenenti miscele di batteri probiotici sono stati documentati, come in precedenza evidenziato, in numerose condizioni cliniche caratterizzate da disregolazione della risposta immune, con esaltazione della componente infiammatoria e/o allergica, dalle malattie infiammatorie croniche dell'intestino alle intolleranze alimentari.

Risulta quindi particolarmente interessante sotto il profilo clinico la miscela probiotica PROXIAN® composta da:

- *L. plantarum* LP01 e *B. lactis* BS05 in formulazione microincapsulata gastroresistente;
- *L. buchneri* Lb26, microrganismo tindalizzato ricco in selenio internalizzato.

Le caratteristiche di questi batteri, come descritto dettagliatamente nelle pagine precedenti, apportano significativi benefici all'ospite.

**LP01 migliora infatti l'integrità della barriera intestinale e manifesta un'attività anti-infiammatoria mediante stimolazione della produzione di citochine anti-infiammatorie, specie IL-10.**

**BS05 esercita una potente azione antiossidante grazie all'aumento del glutathione ridotto (GSH) e della superossidodismutasi (SOD).**

**Lb26 assicura un'elevata biodisponibilità di micronutrienti chiave per la salute**, quali il selenio, che mantiene la normale funzionalità immunitaria intestinale.

## Bibliografia

- Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System. 5th ed. Elsevier 2015.
- Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1219-23.
- Amaretti A, di Nunzio M, Pompei A, et al. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:809-17.
- Anders HJ, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int* 2013;83:1010-6.
- Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *N Eng J Med* 2002;346:1221-31.
- Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008;8:411-20.
- Aureli P, Capurso L, Catellazzi M, et al. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research* 2011; 63:366-76.
- Backhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15718-23.
- Barillaro C, Liperoti R, Martone AM, et al. The new metabolic treatments for sarcopenia. *Aging Clin Exp Res* 2013;25:119-27.
- Barreto FM, Colado Simão AN, Morimoto HK, et al. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutrition* 2014;30:939-42.
- Basseri RJ, Basseri B, Pimentel M, et al. Intestinal methane production in obese individuals is associated with a higher body mass index. *Gastroenterol Hepatol (NY)* 2012;8:22-8.
- Bercik P, Denou E, Collins J, et al. The intestinal microbiota affects central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 2011;141:599-609.
- Bindels LB, Delzenne NM. Muscle wasting: the gut microbiota as a new therapeutic target? *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:2186-90.
- Bowe WP. Probiotics in acne and rosacea. *Cutis* 2013;92:6-7.
- Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *PNAS* 2011;108:16050-5.
- Britton RA, Irwin R, Quach D, et al. Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a meno-pausal ovariectomized mouse model. *J Cell Physiol* 2014;229:1822-30.
- Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol* 2013;14:660-7.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008;57:1470-81.
- Cani PD, Hoste S, Guiot Y, et al. Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Br J Nutr* 2007;98:32-37.
- Cani PD, Neyrinck AM, Lava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007;50:2374-83.
- Cani PD, Possemiers S, Guiot Y, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009;58:1091-103.
- Cevenini E, Caruso C, Candore G, et al. Age-related inflammation: the contribution of different organs, tissues and systems. How to face it for therapeutic approaches. *Curr Pharm Des* 2010;16:609-18.
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012;488:178-84.
- Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1052S-7.
- Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering micro-organisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior. *Nat Rev Neurosci* 2012;13:701-12.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505:559-63.
- David JE, Gable N, Walker-Daniels J, et al. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1248-55.
- De La Serre, C. B., Ellis, C. L. Lee, et al., Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G440-8.
- de Moura JE1, de Moura EN, Alves CX et al., Oral zinc supplementation may improve cognitive function in schoolchildren. *Biol Trace Elem Res* 2013;155:23-8.
- Del Piano M, Ballarè M, Anderloni A, et al. In vitro sensitivity of probiotics to human gastric juice. *Dig Liver Dis* 2006;38:134.
- Del Piano M, Ballarè M, Anderloni A, et al. In vitro sensitivity of probiotics to human bile. *Dig Liver Dis* 2006;38:130.
- Del Piano M, Carmagnola S, Anderloni A, et al., The use of probiotics in healthy volunteers with evacuation disorders and hard stools: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Clin Gastroenterol* 2010;44(Suppl 1):S30-4.
- Del Piano M, Carmagnola S, Ballarè M, et al. Is microencapsulation the future of probiotic preparations? *Gut Microbes* 2011;2:120-3.
- Del Piano M, Carmagnola S, Ballarè M, et al., Comparison of the kinetics of intestinal colonization by associating 5 probiotic bacteria assumed either in a microencapsulated or in a traditional, uncoated form. *J Clin Gastroenterol* 2012;46(Suppl):S85-92.
- Del Piano M, Strozzi P, Barba M, et al., In vitro sensitivity of probiotics to human pancreatic juice. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:170-3.
- Del Piano M, Anderloni A, Balzarini M, et al., The innovative potential of *Lactobacillus rhamnosus* LR06, *Lactobacillus pentosus* LPS01, *Lactobacillus plantarum* LP01, and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LDD01 to restore the gastric barrier effect in patients chronically treated with PPI: a pilot study. *J Clin Gastroenterol* 2012;46(Suppl):S18-26.
- Denechaud PD, Dentin R, Girard J, et al. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008;582:68-73.
- Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, et al. Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular Psychiatry* 2014; 19:146-148.
- Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience* 2010;170:1179-88.

**PROXIAN® trova un utile impiego come integratore alimentare per mantenere o ripristinare l'omeostasi della barriera intestinale, determinando una riduzione dello stato infiammatorio e ossidativo e un miglioramento della funzionalità del sistema immunitario.**

Uno stick di PROXIAN® contiene i seguenti componenti funzionali:

<i>L. plantarum</i> LP01 (LMG P-21021)	1 x 10 <sup>9</sup> cellule
<i>B. lactis</i> BS05 (DSM 23032)	1 x 10 <sup>9</sup> cellule
<i>L. buchneri</i> Lb26 (DSM 16341)	20 mg tindalizzato
Selenio	27,5 mcg (50% VNR)
Zinco	1,5 mg (15% VNR)

VNR: valore normale di riferimento.

La posologia di PROXIAN® prevede una dose giornaliera di uno stick, disiolto in acqua, preferibilmente al mattino a stomaco vuoto o alla sera prima di coricarsi. La durata minima consigliata del trattamento è di 2 mesi.

- Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, et al. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res* 2008;43:164-74.
- Di Mauro G, Bernardini R, Barberi S, et al., Prevention of food and airway allergy: consensus of the Italian Society of Preventive and Social Paediatrics, the Italian Society of Paediatric Allergy and Immunology, and Italian Society of Pediatrics. *World Allergy Organ J* 2016;9:28.
- Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *PNAS* 2011;108:3047-52.
- Eales J, Gibson P, Whorwell P, et al. Systematic review and meta-analysis: the effects of fermented milk with *Bifidobacterium lactis* CNCM I-2494 and lactic acid bacteria on gastrointestinal discomfort in the general adult population. *Therap Adv Gastroenterol* 2017;10:74-88.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-8.
- El Kaoutari A, Armougom F, Gordon JI, et al., The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:497-504.
- Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:9066-71.
- FAO/WHO Report. Probiotics in food. Health and nutrition properties and guidelines for evaluation. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO Food and Nutrition Paper 85. [www.fao.org/3/a-a0512e.pdf](http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf).
- Federici M Diabete e aterosclerosi, due malattie con la stessa "matrice". *Il Diabete* 2010;22:53-62.
- Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH et al. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J Gastroenterol* 2014;20:16079-94.
- Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* 2013;36:305-12.
- Gallo A, Passaro G, Gasbarrini A, et al. Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: an update. *World J Gastroenterol* 2016;22:7186-202.
- Gan XT, Ettinger G, Huang CX, et al. Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Circ Heart Fail* 2014;7:491-9.
- Goldenberg JZ, Ma SS, Saxton JD, et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;12:CD006095.
- Grenham S, Clarke G, Cryan JF et al. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol* 2011;12:94.
- Guo Z, Liu XM, Zhang QX, et al. Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:844-50.
- Halfvarson, Brislaw CJ, Regina Lamendella R et al. Dynamics of the human gut microbiome in Inflammatory Bowel Disease. *Nat Microbiol* 2017;2:17004.
- Hamer HM, Jonkers DM, Bast A, et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nutr* 2009;28:88-93.
- Hanson L, VandeVusse L, Jermé M, et al. Probiotics for treatment and prevention of urogenital infections in women: a systematic review. *J Midwifery Womens Health* 2016;61:339-55.
- Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(9):CD006895.
- Hernandez CJ, Guss JD, Luna M, et al., Links between the microbiome and bone. *J Bone Miner Res* 2016;31:1638-46.
- Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology* 2014;146:1449-58.
- Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. The microbiota modulates gut physiology and behavioral abnormalities associated with autism. *Cell* 2013;155:1451-63.
- Jangi S, Gandhi R, Cox LM, et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun* 2016;7:1201.
- Kashtanova DA, Popenko AS, Tkacheva ON, et al. Association between the gut microbiota and diet: Fetal life, early childhood, and further life. *Nutrition* 2016;32:620-7.
- Kelly JR, Kennedy PJ, Cryan JF, et al. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci* 2015;9:392.
- Kerperien JA et al Development of the Immune System - Early Nutrition and Consequences for Later Life. In: Kanwar JR, ed. Recent Advances in Immunology to Target Cancer, Inflammation and Infections. IntechOpen 2012.
- Khalesi S, Sun J, Buys N, et al. Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension* 2014;64:897-903.
- Kleerebezem, M. Boekhorst, J. van Kranenburg, R et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *PNAS* 2003;100:1990-5.
- Ko JS, Yang HR, Chang JY, et al. *Lactobacillus plantarum* inhibits epithelial dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *World J Gastroenterol* 2007;13:1962-5.
- Koeth RA, Levison BS, Culley MK, et al. Gamma-Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell Metab* 2014;20:799-812.
- Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013;19:576-85.
- Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan U, et al. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity an metabolic syndrome. *Nat Med* 2007;13: 803-11.
- Landi F, Calvani R, Tosato M, et al. Age-related variations of muscle mass, strength, and physical performance in community-dwellers: results from the Milan EXPO Survey. *J Am Med Dir Assoc* 2017;18:e17-24.
- Laugerette F, Vors C, Geloen A, et al. Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *Nutr Biochem* 2011;22:53-9.
- Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 2010;330:1768-73.
- Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, et al. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(Suppl 1):4615-22.
- Lei M, Hua LM, Wang DW. The effect of probiotic treatment on elderly patients with distal radius fracture: a prospective double-blind, placebo-controlled randomised clinical trial. *Benef Microbes* 2016;7:631-7.
- Ley RE, Backheil F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:11070-5.
- Li C, Li X, Han H, et al. Effect of probiotics on metabolic profiles in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e4088.
- Logan AC, Katzman M. Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Med Hypotheses* 2005;64:533-8.
- Logan BK, Jones AW. Endogenous ethanol auto-brewery syndrome as a drunk driving defense challenge. *Med Sci Law* 2000;40:206-15.
- Lutgendorff F, Trulsson LM, van Minnen LP, et al. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G1111-21.
- Lutgendorff F, Nijmeijer RM, Sandström PA, et al. Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis. *PLoS One* 2009;4:e4512.
- Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J AOAC Int* 2012;95:50-60.
- Mardinoglu A, Shoae S, Bergentall M, et al. The gut microbiota modulates host amino acid and glutathione metabolism in mice. *Mol Syst Biol* 2015;11:834.
- Maes M1, Kubera M, Leunis JC, et al. Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. *J Affect Disord* 2012;141:55-62.
- Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 2016;65:330-9.
- Martin FP, Sprenger N, Montoliu I, et al. Dietary modulation of gut functional ecology studied by fecal metabolomics. *J Proteome Res* 2010;1:9:5284-95.
- Martin R, Nauta AJ, Ben Amor K, et al. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Benef Microbes* 2010;1:367-82.
- Martinez RC, Bedani R, Saad SM. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. *Br J Nutr* 2015;114:1993-2015.
- Mathur R, Amichai M, Chua KS, et al. Methane and hydrogen positivity on breath test is associated with greater body mass index and body fat. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E698-702.
- Mayer EA, Padua D, Tillisch K. Altered brain-gut axis in autism: comorbidity or causative mechanisms? *Bioessays* 2014;36:933-9.
- McFall-Ngai M, Hadfield MG, Bosch TCG, et al. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences *PNAS* 2013;110:3229-36.
- McKean J, Naug H, Nikbakht E, et al. Probiotics and subclinical psychological symptoms in healthy participants: a systematic review and meta-analysis. *J Altern Complement Med* 2017;23:249-58.
- Mello AM, Paroni G, Daragjati J, et al. Gastrointestinal microbiota and their contribution to healthy aging. *Dig Dis* 2016;34:194-201.
- Messaoudi M, Lalonde R, Viole N, et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr* 2011;105:755-64.
- Milani C, Ticinesi A, Gerritsen J, et al. Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomic study. *Sci Rep* 2016;6:25945.
- Million M, Maraninch M, Henry M, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:817-25.

Ministero della Salute. *Linee guida probiotici e prebiotici*. Revisione maggio 2013. [www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1016\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_allegato.pdf).

Miyake S, Kim S, Suda W, et al. Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to Clostridia XIVa and IV clusters. *PLoS One* 2015;10:e0137429.

Mogni L, Nicola S, Pane M et al. Selenium and zinc internalized by *Lactobacillus buchneri* Lb26 (DSM 16341) and *Bifidobacterium lactis* Bb1 (DSM 17850): improved bioavailability using a new biological approach. *J Clin Gastroenterol* 2012;46(Suppl):S41-5.

Moloney RD, Desbonnet L, Clarke G et al. The microbiome: stress, health and disease. *Mamm Genome* 2014;25:49-74.

Mowry EM, Glenn JD. The dynamics of the gut microbiome in multiple sclerosis in relation to disease. *Neurol Clin* 2018;36:185-96.

Nadal L, Santacruz A, Marcos A et al. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:758-67.

Nastasi C, Candela M, Bonefeld CM, et al. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte derived dendritic cells. *Scientific Reports* 2015;5: article n. 16148.

Nocerino R, Paparo L, Terrin G et al. Cow's milk and rice fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 prevent infectious diseases in children: a randomized controlled trial. *Clin Nutr* 2017;36:118-25.

Odamaki T, Kato K, Sugahara H, et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol* 2016;16:90.

Ojeda P, Bobe A, Dolan K, et al. Nutritional modulation of gut microbiota - The impact on metabolic disease pathophysiology. *J Nutr Biochem* 2016;28:191-200.

Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Ann Rev Physiol* 2010;72:219-46.

Ouwerkerk JP, de Vos WM, Belzer C. Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013;27:25-38.

Persaud R, Azad MB, Konya T et al. Impact of perinatal antibiotic exposure on the infant gut microbiota at one year of age. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2014;10(Suppl 1):A31.

Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014;14:141-53.

Pirbaglou M, Katz J, de Souza RJ, et al. Probiotic supplementation can positively affect anxiety and depressive symptoms: a systematic review of randomized controlled trials. *Nutr Res* 2016;36:889-98.

Place RF, Noonan EJ, Giardina C. HDAC inhibition prevents NF- $\kappa$ B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I  $\kappa$ B alpha. *Biochem Pharmacol* 2005;70:394-406.

Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2420-8.

Pujia AM, Costacurta M, Fortunato L, et al. The probiotics in dentistry: a narrative review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21:1405-12.

Putignani L, Del Chierico F, Petrucca A, et al. The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatr Res* 2014;76:2-10.

Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012;490:55-60.

Qin J, Li, Raes J et al. A human gut microbial gene

catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.

Rao AV, Bested AC, Beaune TM, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog* 2009;1:6.

Ramezani A, Massy ZA, Meijers B, et al. Role of the gut microbiome in uremia: a potential therapeutic target. *Am J Kidney Dis* 2016;67:483-98.

Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2005;6:507-14.

Rook GA, Raison CL, Lowry CA. Microbiota, immunoregulatory old friends and psychiatric disorders. *Adv Exp Med Biol* 2014;817:319-56.

Putyatisire E, Huang K, Liu Y, et al. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterology* 2016;16:86.

Sarkar A, Lehto SM, Hartt S, et al. Psychobiotics and the manipulation of bacteria-gut-brain signals. *Trends Neurosci* 2016;39:763-81.

Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 2007;87:507-20.

Selhub E, Logan AC, Bested AC. Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. *J Physiol Anthropol* 2014;33:2.

Shalhub S, Parsee A, Gallagher SF, et al. The importance of routine liver biopsy in diagnosing non-alcoholic steatohepatitis in bariatric patients. *Obes Surg* 2004;14:54-9.

Shen NT, Maw A, Tmanova LL, et al. Timely use of probiotics in hospitalized adults prevents *Clostridium difficile* infection: a systematic review with meta-regression analysis. *Gastroenterology* 2017;152:1889-900.

Shimizu M, Hashiguchi M, Shiga T, et al. Meta-analysis: effects of probiotic supplementation on lipid profiles in normal to mildly hypercholesterolemic individuals. *PLoS One* 2015;10:e0139795.

Siezen RJ, van Hylckama Vlieg JE. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microb Cell Fact* 2011;10(Suppl 1):S3.

Smith TJ, Rigassio-Radler D, Denmark R, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* LGG® and *Bi dobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12® on health-related quality of life in college students affected by upper respiratory infections. *Br J Nutr* 2013;109:1999-2007.

Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15451-5.

Steenbergen L, Sellaro R, van Hemert S, et al. A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain Behav Immun* 2015;48:258-64.

Steves CJ, Bird S, Williams FM, et al. The microbiome and musculoskeletal conditions of aging: a review of evidence for impact and potential therapeutics. *J Bone Miner Res* 2016;31:261-9.

Suganami T, Miecia T, Itoh M, et al. Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:45-9.

Sunantliganon C, Thong-Ngam D, Tumwasorn S, et al. *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World J Gastroenterol* 2012;18:2472-80.

Tang WH, Wang Z, Fan Y, et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with

heart failure: refining the gut hypothesis. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:1908-14.

Tang WH, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013;368:1575-84.

Taylor BL, Woodfall GE, Sheedy KE, et al. Effect of probiotics on metabolic outcomes in pregnant women with gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients* 2017;9(5): pii: E461.

Tilg H, Moschen AR, Kaser A. Obesity and the microbiota. *Gastroenterology* 2009;136:1476-83.

Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, et al. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology* 2013;144:1394-401.

Torrallardona D, Harris CL, Fuller MF. Pigs' gastrointestinal microflora provide them with essential amino acids. *J Nutr* 2003;133:1127-31.

Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012;489:242-9.

van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013;368:407-15.

Vaziri ND, Wong J, Pahl M, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int* 2013;83:308-15.

Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012;143:913-916.e7.

Wang Z, Tang WH, Buffa JA, et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J* 2014;35:904-10.

Warthon-Medina M, Moran VH, Stammers AL, et al. Zinc intake, status and indices of cognitive function in adults and children: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* 2015;69:649-61.

Wu Y, Zhang Q, Ren Y, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus* on lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *PLoS One* 2017;12:e0178868.

Yang H, Zhao X, Tang S, et al. Probiotics reduce psychological stress in patients before laryngeal cancer surgery. *Asia Pac J Clin Oncol* 2016;12:e92-6.

Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension* 2015;65:1331-40.

Zaneveld JR, McMinds R, Vega Thurber R. Stress and stability: applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nat Microbiol* 2017;2:17121.

Zeuthen LH, Fink LN, Frokjaer H. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunity* 2008;29:197-208.

Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, Ji L. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One* 2013;8:e71108.

Zhang M, Wang X, Zhou Y, et al. Effects of oral *Lactobacillus plantarum* on hepatocyte tight junction structure and function in rats with obstructive jaundice. *Mol Biol Rep* 2010;37:2989-99.

Zuo HJ, Xie ZM, Zhang WW, et al. Gut bacteria alteration in obese people and its relationship with gene polymorphism. *World J. Gastroenterol* 2011;17:1076-81.