



## Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in Bioingegneria e Bioscienze  
Curriculum di Scienze e Tecnologie per gli Alimenti e la  
Nutrizione

XXXII ciclo a.a. 2016-2017

**Studio della permeabilità intestinale e delle alterazioni del Microbiota nei  
pazienti affetti da Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI) e da  
Disturbi Funzionali (Sindrome dell'Intestino Irritabile, IBS)**

Dott.ssa Silvia Cocca

Coordinatore  
Prof. Michele Cicala

Tutor  
Dott.ssa Annamaria Altomare

Novembre 2020

## Indice

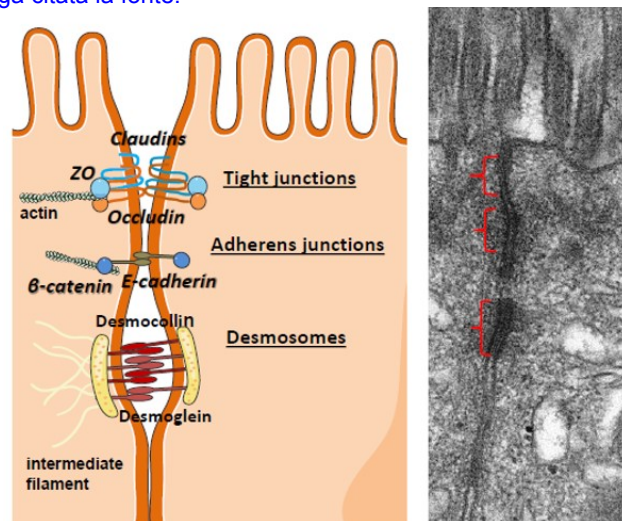
<b>INTRODUZIONE</b>	
<b>CAPITOLO 1. LA BARRIERA GASTRO-INTESTINALE E LE SUE FUNZIONI.....</b>	<b>3</b>
1.1 STRUTTURA DELLA BARRIERA GASTRO-INTESTINALE	
1.2 PERMEABILITA' INTESTINALE: REGOLATORI FISIOLGICI	
1.3 METODI DI MISURAZIONE DELLA PERMEABILITA' INTESTINALE	
<b>CAPITOLO 2. IL MICROBIOTA INTESTINALE .....</b>	<b>8</b>
2.1 IL MICROBIOTA INTESTINALE E LA SUA COMPOSIZIONE	
2.2 FUNZIONI PRINCIPALI	
2.3 METODOLOGIE PER LA CARATTERIZZAZIONE DEL MICROBIOTA INTESTINALE	
<b>CAPITOLO 3. SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE .....</b>	<b>16</b>
3.1 DEFINIZIONE E CENNI EPIDEMIOLOGICI	
3.2 IPOTESI PATOGENETICHE	
3.3 DIAGNOSI	
3.4 RUOLO DELLA DIETA NELL'IBS: PATOGENESI E TERAPIA ALIMENTARE	
<b>CAPITOLO 4. MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI .....</b>	<b>26</b>
4.1 DEFINIZIONE E CENNI DI EPIDEMIOLOGIA	
4.2 IBD E IPOTESI PATOGENETICHE	
4.3 ASPETTI CLINICI DELLE IBD	
4.4 DIAGNOSI	
4.5 CENNI DI TERAPIA	
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	
<b>CAPITOLO 5. PROFILO DEL MICROBIOTA FECALE E MUCOSALE IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI, SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE E CONTROLLI SANI .....</b>	<b>34</b>
5.1 INTRODUZIONE	
5.2 MATERIALI E METODI	
5.3 RISULTATI	
5.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	
<b>CAPITOLO 6. CORRELAZIONE DEI DATI CLINICI E DELLA PERMEABILITA' INTESTINALE IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI IN TRATTAMENTO CON VEDOLIZUMAB.....</b>	<b>53</b>
6.1 INTRODUZIONE	
6.2 MATERIALI E METODI	
6.3 RISULTATI	
6.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	
<b>CAPITOLO 7. ANALISI DEL MICROBIOTA IN PAZIENTI CON SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE: CORRELAZIONE TRA ALIMENTAZIONE E SINTOMATOLOGIA CLINICA.....</b>	<b>70</b>
7.1 INTRODUZIONE	
7.2 MATERIALI E METODI	
7.3 RISULTATI	
7.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>99</b>

## CAPITOLO 1. La barriera gastro-intestinale

### 1.1 Struttura Della Barriera Gastro-Intestinale

Gli epitelii, come quello del tratto respiratorio o del tratto gastrointestinale, formano l'interfaccia tra gli ambienti esterno ed interno dell'organismo costituendo la prima linea di difesa da patogeni o tossine. Il tratto gastrointestinale (GI) presenta una superficie globale di oltre 200 metri quadrati, ed è probabilmente il sistema più esposto verso il mondo esterno del nostro organismo, comprendendo migliaia di composti quali nutrienti e microrganismi enterici. Questa condizione richiede un complesso sistema difensivo che separa il contenuto intestinale dai tessuti ospiti e regola l'assorbimento dei nutrienti, appunto, permettendo interazioni tra il microbiota residente e il sistema immunitario intestinale: questa unità funzionale è chiamata "Barriera Intestinale (Gut Barrier)". La barriera intestinale risulta composta dallo strato mucosale epiteliale, dal microbiota, dal sistema immunitario innato ed adattativo associato alla mucosa, dal sistema linfatico intestinale e dal sistema endocrino/neuroenterico intestinale<sup>1</sup>. Lo strato più esterno della "Gut barrier" è costituito dal microbiota intestinale di cui si tratterà nel dettaglio più avanti, il quale risulta in stretto contatto con un semplice meccanismo di protezione antimicrobica: il muco intestinale, la prima barriera fisica che i batteri incontrano nel tratto intestinale. Esso separa il contenuto endoluminale dallo strato interno della barriera intestinale e contiene prodotti antimicrobici e IgA secretorie. Le cellule caliciformi producono fattori come il "trefoil-factor" e la molecola  $\beta$  simile alla resistina che può stabilizzare i polimeri di mucina e mantenere così l'integrità della barriera<sup>1</sup>.

Lo strato intermedio della "gut barrier" è costituito dall'epitelio intestinale formato dagli enterociti, cellule fondamentali per l'assorbimento dotate di una membrana cellulare a doppio strato fosfolipidico permeabile ai composti lipofili. Ne deriva che l'epitelio intestinale, oltre a essere responsabile dell'assorbimento dei nutrienti, regola anche l'omeostasi di acqua e ioni e funge da barriera protettiva per impedire ai patogeni, che arrivano nel lume intestinale, di superare la barriera epiteliale e provocare infiammazioni della mucosa. In condizioni normali, con lo strato epiteliale intatto, le cellule sono connesse da due principali tipi di giunzioni intercellulari, le giunzioni serrate (*tight junctions*, *TJ*) e le giunzioni aderenti (*adherens junctions*, *AJ*), che controllano la permeabilità paracellulare attraverso gli spazi intercellulari. Nelle barriere epiteliali, le TJ e le AJ sono ben definite e distribuite: le TJ costituiscono la parte apicale, mentre le AJ sono localizzate nella parte baso-laterale sotto le TJ (**Figura 1**). Entrambe sono connesse al citoscheletro di actina.



**Figura 1.** Struttura della barriera gastrointestinale

Le giunzioni aderenti sono il risultato di un'associazione complessa tra molteplici componenti e giocano un ruolo centrale nella formazione dei contatti tra cellule vicine e nella stabilizzazione dell'adesione. Una perdita delle giunzioni aderenti implica un'interruzione nei contatti cellula-cellula e cellula-matrice con una serie di conseguenze che portano all'apoptosi prematura. Le caderine (120 kDa) sono componenti delle AJ e sono proteine con un segmento transmembrana e 5 domini extracellulari ripetuti. Le claudine (18-27 kDa) sono proteine con 2 loop extracellulari e un dominio citoplasmatico C-terminale. Costituiscono un'ampia famiglia genica in cui sono state identificate 24 isoforme che sono espresse in maniera tessuto-specifica e una mutazione o una delezione di uno dei membri di questa famiglia può avere notevoli effetti sulla funzione dell'organo. Le occludine (65 kDa) sono proteine con 4 domini transmembrana e 2 loop extracellulari. Le proteine periferiche di membrana zonula occludens (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. La proteina che gioca il ruolo centrale è ZO-1 che direttamente e indirettamente collega le proteine integrali di membrana (occludine e claudine) alle altre proteine citoplasmatiche delle TJ e al citoscheletro di actina<sup>2</sup>.

Le cellule immunitarie della mucosa intestinale sono organizzate in un sistema specializzato e compartimentato noto come "tessuto linfoide associato all'intestino" o Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT). È uno dei più grandi organi linfoidei, che induce sia le risposte immunitarie a microrganismi patogeni e sia la tolleranza immunitaria ai batteri commensali. Questa capacità è mediata da cellule dendritiche e cellule M nelle placche di Peyer. Queste cellule sono in grado di internalizzare microrganismi e macromolecole e di presentare poi gli antigeni ai linfociti T naïve, i quali si differenziano e sono responsabili delle risposte immunitarie, incluso la produzione di diversi tipi di citochine<sup>1</sup>.

## 1.2 La permeabilità intestinale: regolatori fisiologici

L'omeostasi dell'epitelio intestinale e la regolazione della polarità cellulare dell'epitelio è mantenuta da una complessa interazione di meccanismi regolatori multipli come WNT, NOTCH, HIPPO, *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) / proteina morfogenetica ossea (BMP) e Hedgehog pathways. Questi pathways mantengono l'architettura cripta-villo e regolano i vari organi. La AJ e le TJ, come già accennato, svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della polarizzazione, proliferazione e differenziazione cellulare. I domini intracellulari di queste proteine transmembrana interagiscono con le proteine che costituiscono la struttura citosolica, come ad esempio la zonula occludens, che a loro volta ancorano le proteine transmembrana al citoscheletro di actina. L'interazione delle proteine Tight Junction con il citoscheletro di actina contribuisce all'integrità della barriera gastro-intestinale. In questo setting, il microbiota intestinale ed i nutrienti, in condizioni fisiologiche, svolgono un ruolo cruciale. Componenti della dieta come acidi grassi polinsaturi omega-6 (v6-PUFA), acidi grassi saturi a catena lunga, proteine e carboidrati digeribili, sono associati all'infiammazione intestinale e all'aumento della permeabilità intestinale, al contrario, acidi grassi polinsaturi omega-3 (v3-PUFA), vitamina D, trigliceridi a catena media, peptidi bioattivi derivati dagli alimenti, alcuni probiotici e prebiotici e carboidrati non digeribili riducono la permeabilità intestinale e migliorano quindi l'integrità mucosale<sup>1-3</sup>.

Alcuni studi sulla resistenza trans-epiteliale (metodo di valutazione della permeabilità mucosale) nel ratto mostrano che il colon risulta meno permeabile dell'intestino tenue e ciò deriva da una maggiore espressione di alcuni tipi di claudine: -1, 3, 4, 5 e 8. All'interno della mucosa del piccolo intestino ci sono diversi gradi di permeabilità sia nei villi che nelle cripte: *Arrieta et al.* hanno dimostrato che la dimensione dei pori a livello della punta del villus è di 4–5 Å, alla base del villus 10–15 Å e alla base della cripta > 20 Å. Queste dimensioni dei pori consentirebbero il passaggio del mannitolo (~ 3 Å) attraverso la punta del villus, ed il trasporto del solvente può verificarsi in questa parte del villus data la distribuzione del trasportatore di sodio-glucosio (SGLT1) nella metà superiore dei villi. Inoltre, le molecole utilizzate per valutare la permeabilità come il lattulosio (~ 6 Å) e il 51Cr-EDTA (5.3 Å), sono in grado di passare attraverso la barriera alla base dei villi ed infine l'inulina (18 Å), può essere assorbita alla base delle cripte<sup>2</sup>.

## 1.3 Misurazione della permeabilità intestinale

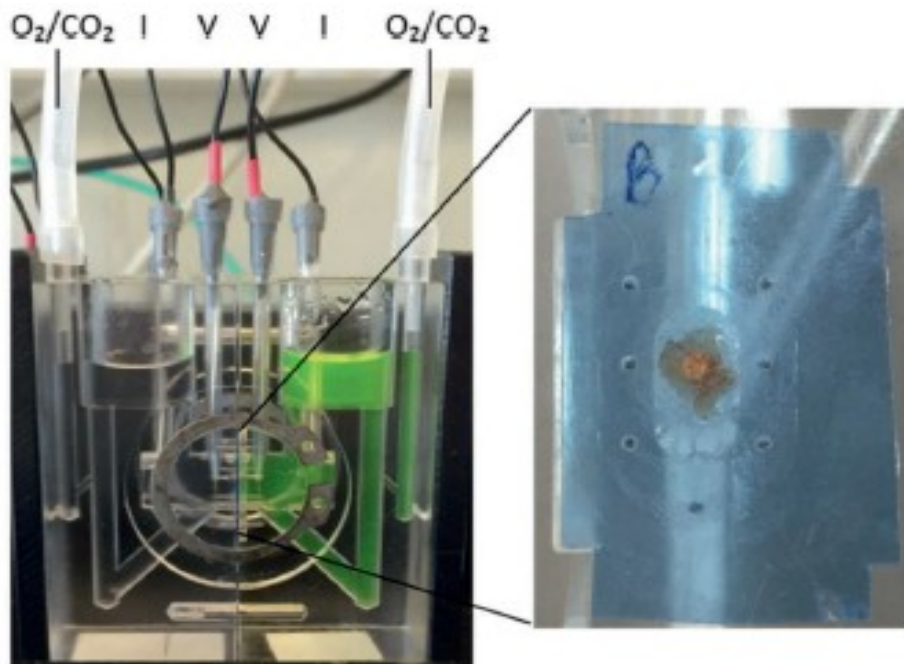
Sono diverse le metodiche che possono essere utilizzate per valutare la permeabilità intestinale, e l'utilizzo di una di esse rispetto ad un'altra dipende dai diversi setting di lavoro, dall'accessibilità dei campioni necessari per la valutazione nonché dal quesito clinico prefissato. Ad oggi tali metodiche sono impiegate soprattutto a scopo di ricerca e la loro applicazione clinica non è routinaria. Tali indagini possono essere schematicamente divise in metodiche *in vitro*, *in vivo* ed *ex vivo* (**Tabella 1**).

<b>Approccio</b>	<b>Cosa studia</b>	<b>Metodologia</b>
<b><i>In vitro</i></b>	Permeabilità intestinale  Integrità epiteliale	- Studio della funzione epiteliale (trasporto di molecole, attività secretoria, conduttività degli ioni) su un monostrato di cellule; - Analisi strutturale delle proteine di adesione intercellulare (tramite immunoistochimica, immunofluorescenza, real-time PCR quantitativa)
<b><i>In vivo</i></b>	Permeabilità intestinale	- Misurazione dell'escrezione urinaria di <i>probes</i> ingeriti (zuccheri, PEG 4000/400, <sup>51</sup> Cr-EDTA)
<b><i>Ex vivo</i></b>	Permeabilità intestinale  Integrità epiteliale	- Analisi del passaggio di molecole attraverso l'epitelio, dell'attività secretoria e della conduttività ionica su biopsie mucosali umane o su tessuti animali (tramite Ussing Chamber); - Analisi dell'espressione genica/proteica delle proteine di adesione intercellulare dopo fissazione del tessuto (tramite immunoistochimica, immunofluorescenza, real-time PCR quantitativa)

**Tabella 1:** Metodiche impiegate per la valutazione della funzionalità della barriera intestinale. Tradotta e modificata da González-Castro AM, et al<sup>4</sup>.

**Metodiche ex vivo:** Con questa metodica si fa riferimento alla tecnica delle Ussing Chamber (**Figura 2**), un dispositivo utilizzato per la valutazione del passaggio di ioni o altre sostanze attraverso un campione biologico fresco che viene montato tra le due camere dell'apparecchio. Questa tecnica può essere utilizzata per studiare la permeabilità di qualsiasi tipo di epitelio e, nel caso specifico di quello intestinale, possono essere utilizzati come campione delle biopsie umane o animali oppure reperti chirurgici. In ogni caso è necessario che il tessuto venga analizzato a fresco poiché la vitalità di tali campioni è limitata ad un massimo di due ore dopo il prelievo<sup>5,6</sup>. La metodica consiste nel posizionamento del campione tra le due camere dell'apparecchio, all'interno di un apposito adattatore che ci permette di orientare correttamente il pezzo, distinguendo il versante apicale e quello baso-laterale dell'epitelio intestinale. Le due camere dell'apparecchio vengono poi riempite con la medesima quantità di una soluzione di Ringer e collegate ad un sistema di perfusione che consente l'ossigenazione del campione e la messa in movimento del liquido contenuto nei pozzetti. In questo modo si genera un passaggio passivo di ioni dal versante apicale a quello baso-laterale del nostro epitelio intestinale, che viene registrato sotto forma di una differenza di potenziale transepiteliale da due coppie di elettrodi posizionati in entrambe le camere, in prossimità del tessuto. Viene infine aggiunta al circuito una seconda coppia di elettrodi posizionati uno in corrispondenza di ogni camera. Questi elettrodi emettono una corrente elettrica che, grazie alla legge di Ohm, ci consentirà di misurare la resistenza elettrica transepiteliale (TEER) in base alle variazioni di differenza di potenziale transepiteliale registrate. In base all'esperimento è possibile anche aggiungere una molecola marcata come la fluoresceina nella camera adiacente al versante apicale dell'epitelio campione per valutarne poi la concentrazione nella camera adiacente al versante baso-laterale ad intervalli di tempo regolari. Si può ottenere in questo modo una curva della permeabilità

della molecola utilizzata, correlandola ai valori di TEER registrati al momento dei vari prelievi. Ad oggi tale metodica è considerata da diversi autori il *gold standard* per la valutazione della permeabilità intestinale<sup>7</sup>. Gli svantaggi di tale metodica sono rappresentati dalla necessità di campioni biologici che devono essere analizzati in tempi brevi in base alla loro vitalità, dalla laboriosità delle indagini e soprattutto dal limite intrinseco che si incontra nel voler valutare la permeabilità su un piccolo campione, che viene isolato dai complessi meccanismi che interagiscono con la funzione di barriera dell'intestino, correndo il rischio che i risultati dell'analisi rispecchino solo parzialmente quello che succede in vivo.



**Figura 2:** A sinistra: raffigurazione di una Ussing Chamber; A destra: dettaglio del filtro in cui viene alloggiato il campione biotico e che viene successivamente montato tra le due camerette di cui è dotato l'apparecchio

*Silvia Cocca*

## CAPITOLO 2. IL MICROBIOTA INTESTINALE

### 2.1 Il microbiota intestinale e la sua composizione

L'intestino umano rappresenta uno degli ecosistemi microbici con la maggiore densità di popolazione presente in natura. Le dimensioni del microbiota intestinale umano, con un carico di  $10^{13}$ - $10^{14}$  microrganismi ed un peso pari a circa 1 kg, superano di gran lunga quelle delle altre comunità microbiche associate alle superfici del corpo umano, e sono circa 10 volte superiori rispetto al numero totale delle nostre cellule somatiche e germinali. La grande maggioranza di questi microrganismi risiede nel colon dove le densità di popolazione raggiungono tipicamente valori di  $10^{11}$ - $10^{12}$  microrganismi/ml di contenuto luminale. Se si considera che la terra è abitata da 6.5 miliardi di esseri umani, la riserva intestinale globale risulta allora costituita da  $10^{23}$ -  $10^{24}$  cellule microbiche, un numero inferiore di soli 5 ordini di grandezza rispetto agli oceani terrestri che si stima contengano  $10^{29}$  cellule<sup>8</sup>. Il microbiota intestinale umano, spesso indicato come “*a forgotten organ of the human body*”, contiene un numero di geni almeno 100 volte superiore rispetto al genoma umano. Il numero di geni presenti nell'uomo è stato infatti calcolato essere 31897, un valore relativamente piccolo se si considerano i 7547 geni del lievito, le 29388 ORF di *Arabidopsis thaliana* e le 23399 ORF del nematode *Caenorhabditis elegans*<sup>9</sup>.

Lo sviluppo intestinale di un individuo dipende da numero e tipo di microrganismi con cui l'individuo stesso entra in contatto nelle prime fasi di crescita, e dal suo patrimonio genetico. La complessità di questi processi di interazione e la stocasticità delle popolazioni microbiche con cui l'individuo entra in contatto contribuiscono a rendere unico il microbiota di ogni singolo individuo adulto. Quest'unica e specifica comunità microbica è dotata di una struttura che si mantiene relativamente stabile nel tempo<sup>10,11</sup>. La composizione del microbiota può, infatti, subire alterazioni in caso di disordini, come diarrea acuta, durante trattamento antibiotico e, in misura minore, in seguito a modifiche nella dieta, ma i pattern individuali tendono a rimanere costanti<sup>12</sup>. Nell'ambito di un determinato habitat intestinale, alcuni membri microbici sono riconosciuti quali autoctoni o “residenti”, mentre altri, alloctoni, derivano dal cibo ingerito, dall'acqua o da altre componenti dell'ambiente esterno, il che rende questo ecosistema estremamente dinamico.

La relazione che si instaura tra ospite e componenti del microbiota è stata spesso descritta come commensale (un partner trae beneficio mentre l'altro non risulta influenzato), mentre è sicuramente più realistico definirla simbiotica o mutualistica (entrambi i partner incrementano il loro fitness). In questo rapporto mutualistico, l'ospite acquisisce energia, mediante assorbimento dei prodotti finali delle fermentazioni batteriche [short chain fatty acid (SCFA)], mentre il microbiota si



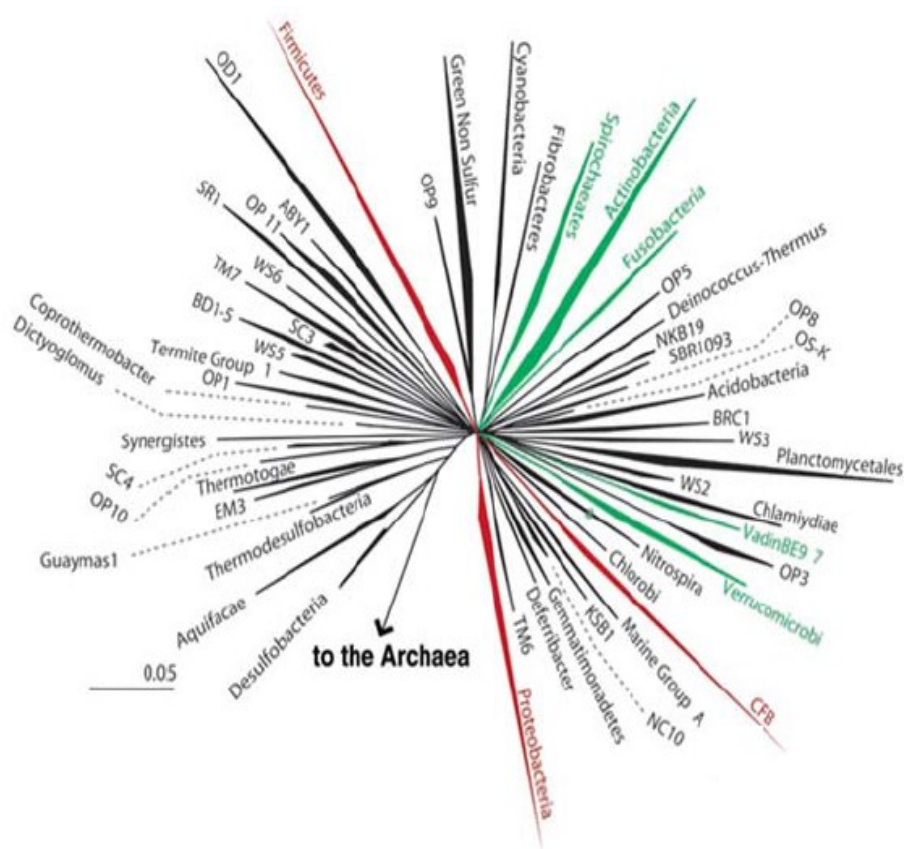
trova in un ambiente anossico protetto con un ricco buffet di nutrienti e a temperatura relativamente costante<sup>9</sup>.

Molteplici studi di biologia molecolare basati sul sequenziamento della regione 16S DNA ribosomiale microbica hanno rivelato come la maggior parte dei batteri d'origine fecale appartenga a due delle maggiori stirpi filogenetiche: Bacteroidetes e Firmicutes. Si ritiene che entrambi i phyla derivino da un precursore comune: il *Methanobrevibacter smithii*<sup>13</sup>. Il maggior numero delle scoperte relative al microbiota sono però spesso legate ai soli campioni fecali: ci sono infatti scarsi studi sulla microbiota del colon ascendente, tratto in cui differisce da quella fecale; allo stesso modo possediamo poche informazioni riguardanti la microbiota aderente alle pareti del colon stesso, il microbiota mucosale. La maggior parte delle comunità microbiche intestinali appartiene al regno dei Bacteria e degli Archea. Il primo, più numeroso nel tratto intestinale, comprende molte sottoclassi, diversamente distribuite: Bacteroidetes (23%) che comprende il genere *Bacteroides*; Firmicutes (64%) che comprende Bacilli, Clostridi e *Mollicutes*; Proteobacteria (8%), batteri Gram negativi come ad esempio *Escherichia coli* ed *Helicobacter pylori*; Actinobacteria (3%) che comprende specie quali i *Bifidobacterium*<sup>12,14</sup>. Tra tutti i microrganismi presenti le specie dominanti in sede intestinale di un individuo adulto, come detto in precedenza, si possono riassumere in due gruppi principali: Bacteroidetes e Firmicutes.

BACTEROIDETES: costituiscono circa il 24-25% del microbiota intestinale e sono costituiti da circa 20 generi, di questi la classe Bacteroidales è la più studiata, in particolare il genere *Bacteroides*. Si tratta di specie anaerobiche Gram negative, con struttura a bastoncino, non formanti spore e resistenti ai sali biliari, con notevoli capacità adattative. Il *Bacteroidetes thetaiotaomicron* (BT) è il principale componente del normale microbiota intestinale; ha una grande capacità di digestione dei polisaccaridi in quanto presenta: due proteine di membrana che legano ed importano amido, 226 glicosidasi (contro le 98 dell'uomo), 64 polisaccaridasi (contro 1 dell'uomo). Il BT ha sviluppato la capacità di "aiutare" l'organismo ospite a recuperare ed usare molti carboidrati della dieta, oltre ai glicani del muco<sup>15</sup>. In generale i *Bacteroidetes* possiedono un complesso sistema per metabolizzare i carboidrati inutilizzati dall'organismo ospite.

FIRMICUTES: il nome deriva dal latino "firmus" (forte) e "cutis" (pelle), sono infatti caratterizzati da uno strato di peptidoglicano che conferisce loro durezza. Diverse specie producono endospore che possono sopravvivere in condizioni estreme. Sono batteri Gram positivi, comprendenti 250 generi 17 suddivisi in tre classi: Clostridi, Bacilli e Mollicuti. I Clostridi sono anaerobi obbligati in grado di produrre endospore, se coltivati in ambiente con basso potenziale redox sono estremamente attivi dal punto di vista fermentativo: metabolizzano sostanze organiche (carboidrati e proteine) con produzione di alcoli, acido acetico, acido butirrico, acido succinico e

sostanze volatili come anidride carbonica, idrogeno e acido solfidrico. Il *Clostridium perfringens*, il *Clostridium bifermentans* e il *Clostridium ramosum* sono le specie più comuni isolati nell'uomo. Più dell'8% degli adulti invece sono portatori sani di *Clostridium difficile*, il quale può causare diarrea, febbre, con sviluppo di colite pseudo membranosa in soggetti che assumono antibiotici. I Bacilli, come i clostridi, sono in grado di produrre endospore ma a differenza di questi sono batteri aerobi facoltativi o obbligati. Caratterizzati da una tipica forma a bastoncino, comprendono due ordini: Bacillales (*Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*) e i Lactobacillales (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* etc.). I Mollicutes (dal latino "mollis", ovvero tenero, e "cutis", cute)



**Figura 3.** Global distribution del microbiota nell'intestino

sono invece una classe di batteri privi di parete, di ridotte dimensioni, in genere 0.2-0.3 micron. I più noti sono i Micoplasmi<sup>16</sup>.

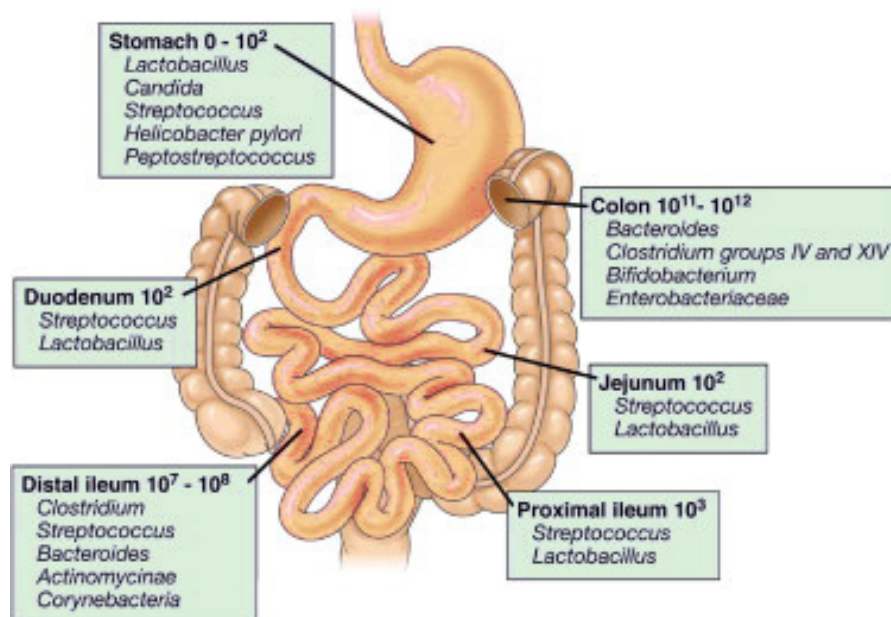
La diversità degli eucarioti presenti nel microbiota intestinale umano in passato è stata determinata mediante approcci coltura-dipendenti, tuttavia successivamente mediante l'utilizzo di un metodo coltura-indipendente, denominato fingerprinting oligonucleotidico dei geni rRNA (OFRG), Scupham *et al.* (2006) hanno identificato i generi *Acremonium*, *Monilinia*, *Fusarium*, *Cryptococcus/Filobasidium*, *Scleroderma*, *Catenomyces*, *Spizellomyces*, *Neocallimastix*,

*Powellomyces*, *Entophlyctis*, *Mortierella*, *Smittium*, e l'ordine *Mucorales*, appartenenti ai 4 maggiori phyla fungini *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* e *Zygomycota*<sup>17</sup>. Nell'uomo, le popolazioni fungine residenti sono state analizzate inizialmente in un numero limitato di pazienti affetti da pouchite e trattati con probiotici, successivamente anche nei soggetti affetti da Crohn e colite ulcerosa. In questa popolazione di pazienti il "fungoma" è stato considerato parte della patogenesi della disbiosi nelle malattie infiammatorie croniche intestinali<sup>18,19</sup>. Infine, i virus rappresentano un ulteriore ed importante costituente del microbiota intestinale umano (il cosiddetto viroma) come indicato da studi recenti che riportano l'identificazione, nelle feci umane, di più di 1200 genotipi virali con una densità fino a 10<sup>9</sup> virioni/g di materiale secco<sup>20</sup>, e di batteriofagi nella mucosa di soggetti sani e affetti da malattie infiammatorie intestinali (MICI)<sup>21</sup>. I batteriofagi esercitano una forte influenza sulla diversità batterica e sono coinvolti in fenomeni di disbiosi, destabilizzando le comunità batteriche<sup>22</sup>. Più di un decennio addietro, Lepage e colleghi (2008) hanno misurato la comunità virale totale associata alla mucosa intestinale in individui sani ed in pazienti affetti da malattia di Crohn. Mediante microscopia ad epifluorescenza, sono state osservate particelle virus-simili (VLP) con una media di 1.2 x 10<sup>9</sup> VLP per campione bioptico (4.4 x 10<sup>7</sup> - 1.7 x 10<sup>10</sup>, 10<sup>10</sup>/mm<sup>3</sup> di tessuto). Particelle virali corrispondenti a batteriofagi con morfotipi di Siphoviridae, Myoviridae e Podoviridae, sono risultate dominanti, ed ogni individuo è apparso colonizzato da un'unica famiglia fagica prevalente<sup>21,23</sup>.

## 2.2 Distribuzione del microbiota lungo il tratto gastrointestinale

Il microbiota intestinale umano differisce a livello quantitativo e qualitativo lungo il tratto gastrointestinale<sup>23,24</sup>. A queste differenze si aggiunge una stratificazione orizzontale, con la presenza di diverse comunità microbiche nel lume intestinale, nello strato di muco, nelle cripte e direttamente aderenti alle cellule epiteliali. In termini quantitativi, esofago e stomaco presentano il minore carico batterico. Il normale microbiota esofageo è relativamente semplice in termini di composizione in specie, e i batteri più coltivabili sono anaerobi facoltativi che derivano dalla cavità orale, quali streptococchi e lattobacilli (10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup> di superficie mucosale). Fatta eccezione per le poche ore immediatamente successive ad un pasto, lo stomaco umano è per lo più privo di un significativo microbiota, ma contiene solo relativamente bassi livelli di lattobacilli e di altri microrganismi acido resistenti (10<sup>1</sup>-10<sup>2</sup>/ml di contenuto), generalmente provenienti dalla cavità orale. Nella mucosa gastrica è stata evidenziata anche la presenza di *Helicobacter pylori*, agente eziologico di gastrite, ulcera gastrica e duodenale, implicato nel cancro allo stomaco, presente nel 30-80% di individui sani. Il breve tempo di residenza (1-2 h), l'acidità del contenuto gastrico, la presenza di ossido nitrico, che deriva dalla riduzione batterica del nitrato salivario, e di enzimi

proteolitici, sono i principali fattori che rendono lo stomaco una barriera al continuo accesso di batteri dall'ambiente esterno verso le parti distali del tratto gastrointestinale<sup>25</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Composizione e concentrazioni luminali delle specie microbiche dominanti nelle differenti regioni del tratto gastrointestinale umano (adattato da B. Sartor *Gastroenterology* 2008)

Il rapido flusso di materiale attraverso l'intestino tenue (tempo di transito del materiale digerito compreso tra 2 e 4 h) previene una permanente colonizzazione microbica di questo tratto. Il microbiota del digiuno appare dominato da specie appartenenti al genere *Streptococcus* ma, solo a livello ileo-cecale, è presente una significativa popolazione di batteri [10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup>/g di contenuto intestinale]<sup>25</sup>. L'intestino crasso rappresenta il sito del tratto gastrointestinale con il più alto numero di batteri e la maggiore diversità microbica [10<sup>11</sup>-10<sup>12</sup>/ml di contenuto luminale, pari a circa il 60%]<sup>12,26</sup>. Si tratta per la maggior parte di anaerobi stretti, spesso non sporigeni, il 54-75% dei quali Gram-positivi<sup>26</sup>. La composizione del microbiota è estremamente variegata ed è influenzata da fattori temporali e spaziali. L'intestino fetale dei mammiferi è sterile, e la colonizzazione inizia immediatamente dopo la nascita ed è influenzata dall'alimentazione, dal trasferimento materno, dagli stimoli ambientali e dall'uso di antibiotici<sup>27</sup>.

### 2.3 Funzioni principali del microbiota

Numerosissime sono le funzioni e gli effetti che il microbiota intestinale ha sull'ospite, ed essi sono il risultato delle interazioni tra batteri, epitelio ed altre cellule umane, quali cellule del sistema immunitario e neuroni enterici.

**a) Attività metaboliche:** Dal momento che la flora intestinale codifica per un numero sostanzialmente maggiore di geni rispetto al suo ospite umano, ne consegue che essi sono in grado di intraprendere una serie di funzioni metaboliche che gli esseri umani non sono in grado di fare o che sono solo in grado di fare in modo limitato. Ad esempio, i batteri intestinali sono in grado di produrre una varietà di vitamine, sintetizzare tutti gli amminoacidi essenziali e non essenziali, ed effettuare biotrasformazione di bile. Inoltre, il microbioma fornisce vie biochimiche vitali per il metabolismo dei carboidrati non digeribili, che comprendono polisaccaridi, quali amidi resistenti, cellulosa, emicellulosa, pectine, gomme; alcuni oligosaccaridi che sfuggono alla digestione; zuccheri non assorbiti e alcoli provenienti dalla dieta. Questa alta funzionalità determina recupero di energia e di substrati assorbibili sia per l'ospite che per la crescita e proliferazione batterica. Quindi i carboidrati rappresentano una delle principali fonti di energia nel colon<sup>1,16</sup>.

**b) Modulazione del sistema immunitario:** la flora batterica intestinale rappresenta uno stimolo per lo sviluppo e la regolazione del sistema immunitario dell'ospite. A questo scopo l'epitelio intestinale è fornito di un'insieme di recettori definiti TLRs (Toll-like receptors) in grado di riconoscere eventuali patogeni venuti a contatto con la mucosa intestinale. Il segnale intracellulare che viene a scatenarsi provoca la produzione di citochine in grado di coordinare le risposte di cellule infiammatorie e regolare l'attività di cellule immunocompetenti<sup>27</sup>.

**c) Funzioni protettive:** Molti batteri intestinali producono composti antimicrobici e competono per i nutrienti e i siti di attaccamento dell'intestino, impedendo in tal modo la colonizzazione da parte di agenti patogeni. Questa operazione è chiamata "*the barrier or competitive-exclusion effect*". Le cellule ospiti nella parete intestinale hanno siti di attacco che possono essere utilizzati da batteri patogeni per entrare nelle cellule epiteliali. In studi in vitro, i batteri non patogeni visivamente compongono per questi siti di attacco, al confine delle cellule epiteliali intestinali, impedendo l'attaccamento e il successivo ingresso di patogeni, batteri entero-invasivi, nelle cellule epiteliali. Inoltre, poiché i batteri competono per le sostanze nutritive nelle loro immediate vicinanze e mantengono il loro habitat collettivo amministrando e consumando tutte le risorse disponibili, possono concorrere con i batteri patogeni per le risorse, con la sola forza numerica. Infine, il microbioma intestinale può inibire la crescita dei suoi concorrenti mediante la produzione di sostanze antimicrobiche note come batteriocine, la capacità di sintetizzare queste proteine battericide è ampiamente distribuita in tutto il tratto gastrointestinale<sup>12,28</sup>.

#### 1.4 Metodologie per la caratterizzazione del microbiota intestinale

Gli studi del microbioma possono suddividersi principalmente in due categorie: l'approccio metagenomico e l'approccio basato sugli ampliconi. Nel primo caso si sequenzia l'intero genoma

raccolto dal microbiota, cioè da tutti i microrganismi presenti in un dato sito, ricorrendo spesso all'alternativa “*shotgun*”; in tal caso il genoma viene dapprima frammentato in modo casuale ed in seguito si procede con l'amplificazione ed il sequenziamento dei singoli pezzi. Le *read* ottenute possono essere assemblate per formare sequenze più lunghe dette *contigs*, in modo da ricostruire l'ordine delle catene di DNA originarie, precedenti la frammentazione. L'assemblaggio delle *read* avviene grazie ad appositi software che identificano porzioni di sequenza che esse hanno in comune.

È inoltre di fondamentale importanza nello studio del microbioma, l'individuazione dell'appartenenza tassonomica dei componenti delle comunità microbiche. A tal scopo si eseguono confronti tra le *read* ed un database che cataloga l'associazione tra un certo genoma e un particolare livello tassonomico. Il secondo approccio per lo studio del microbioma è invece quello basato sugli ampliconi; in questo caso non si sequenzia l'intero genoma del microbiota, bensì solo alcuni geni considerati filogeneticamente significativi (*markers*). Nella maggior parte dei casi, in questo ambito, si sceglie come marker il gene ribosomiale 16S; esso si ritrova in tutti gli organismi viventi e presenta sia regioni ipervariabili, sia regioni costanti. Queste ultime sono comuni a tutti gli organismi e consentono di distinguere il gene 16S dall'intero genoma, mentre le regioni ipervariabili permettono di inferire l'identità tassonomica degli organismi fino a livelli molto bassi (famiglia o genere). Questo è possibile utilizzando dei particolari *database*, i quali sono più grandi e dettagliati di quelli disponibili per l'approccio metagenomico. Solitamente l'inferenza tassonomica è preceduta dal raggruppamento delle sequenze in base ad una predeterminata soglia di similarità, ottenendo così le OTU. In pratica, si calcola la distanza tra le sequenze, intesa come distanza genetica e cioè come misura quantitativa della divergenza tra due sequenze, come frazione di *mismatch* riscontrati tra le sequenze allineate. Avendo a disposizione queste misure è possibile procedere con il *clustering*. Il *clustering* avviene attraverso due *step*: nel primo si calcola un coefficiente che esprima la similarità tra i dati, nel secondo si rappresenta graficamente l'associazione tra i dati simili (mediante alberi gerarchici o mediante gruppi). Il risultato finale del *clustering* è che le sequenze che rappresentano diversi generi si sono dunque raggruppate in diverse OTU. Solitamente le OTU con un tasso di diversità entro il 3% sono considerate rappresentative della stessa specie, mentre entro il 5% sono da considerarsi formate da geni provenienti da organismi probabilmente di specie diversa ma dello stesso genere. Il numero delle OTU ottenuto è indice dell'abbondanza e della diversità tassonomica di una certa comunità microbica. Un tipico approccio all'analisi del microbiota umano è il calcolo della sua biodiversità, al fine di caratterizzare la varietà di specie batteriche presenti. Si tenga poi conto che dal sequenziamento del microbioma umano si ottengono grandi quantità di dati, si necessita perciò di tecniche atte a ridurre

la dimensione dei data set, oltre che ad analizzarli statisticamente, ad esprimerli graficamente in modo da consentirne un'analisi visiva immediata ed interpretare le risposte simultanee di più dati in relazione a certe variabili<sup>29</sup>.

Un altro obiettivo nell'analisi dei dati multivariati, oltre che rappresentarli in un diagramma di ordinamento o raggrupparli in base alla loro similarità, è quello di valutare se sussistono differenze tra gruppi di soggetti in base ai valori di abbondanza dei generi (o OTU). Inoltre, è di interesse capire se la differenza tra gruppi è maggiore o minore di quella misurata tra i soggetti di uno stesso gruppo. A tal fine, i metodi utilizzati nel presente studio sono quattro: calcolo degli indici di biodiversità ed il test di Wilcoxon:

- **alpha-diversità**: intesa come il numero (la ricchezza) e la distribuzione (uguaglianza) di taxa previsto entro una singola popolazione; nell'ambito dell'alfa diversità si annoverano 3 indicatori principali tra cui l'Indice di Shannon: che valuta l'incidenza quantitativa delle diverse specie all'interno del microbiota del soggetto considerato; il valore minimo assunto dall'indice è 0 e indica che è presente un'unica specie. Il valore massimo possibile è  $H'_{max} = \log_e(s)$  ed evidenzia che le abbondanze relative delle specie sono uguali e dunque la biodiversità è massima.

- **beta-diversità**: quando si confrontano più popolazioni la diversità beta descrive quanti taxa sono condivisi tra di esse.

Quindi mentre la diversità alpha agisce come una statistica riassuntiva di una popolazione singola, la beta diversità agisce come un punteggio di somiglianza tra le popolazioni<sup>30</sup>.



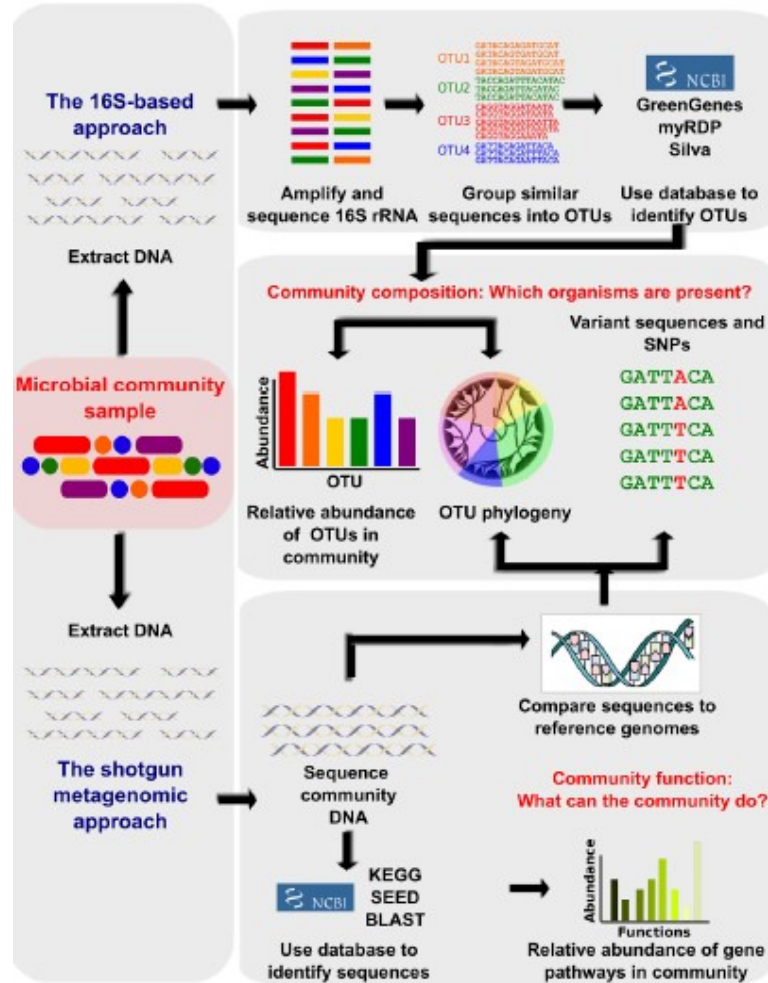


Figura 5. Rappresentazione grafica dell'analisi del microbiota, adattato da *Morgan et al. 2012*



## CAPITOLO 3. SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE

### 3.1 Definizione e cenni epidemiologici

La Sindrome dell'Intestino Irritabile (IBS) è definita come un disordine funzionale caratterizzato comunemente da sintomi quali dolori addominali, diarrea, meteorismo, e stipsi. Il tipo, la durata e la gravità dei sintomi varia da paziente a paziente. Per alcuni pazienti la sintomatologia è considerata lieve mentre per altri, può essere invalidante tanto da impedire loro di partecipare alle attività quotidiane. A seconda del sintomo predominante, l'IBS viene classificato come: IBS diarrea-predominante (IBS-D), IBS stipsi predominante (IBS-S) o ancora un quadro alternato di questi due (IBS-A). Studi epidemiologici indicano che i sintomi compatibili con il quadro clinico della IBS sono presenti dal 15 al 25% della popolazione dei Paesi Industrializzati, con un picco di incidenza tra i 15 ed i 34 anni di età e con una frequenza circa doppia nel sesso femminile rispetto al sesso maschile<sup>31</sup>.

### 3.2 Ipotesi patogenetiche

Come tutti i disordini funzionali gastrointestinali l'eziopatogenesi dell'IBS non è nota, tuttavia si ipotizza che le sue manifestazioni sintomatologiche siano causate da più fattori concorrenti<sup>32</sup>. Differenti meccanismi sono stati implicati nella patogenesi di IBS, inclusi una motilità alterata, ipersensibilità viscerale, infiammazione di basso grado, e lo stress. Fattori genetici potrebbero modulare l'elaborazione centrale di segnali gastrointestinali, l'infiammazione e la risposta immune locale, possibilmente predisponendo a IBS. Sembra ragionevole postulare che affinché l'IBS si manifesti dovrebbero verificarsi diverse anomalie contemporaneamente.

A. **Alterata motilità del colon e del tenue:** Nell'IBS, la sintomatologia può verificarsi attraverso multipli meccanismi colici, che comprendono un aumento delle *high-amplitude propagated contractions* (HAPCs), un'aumentata risposta gastrocolica (prolungata attività motoria rettosigmoidea in risposta a un pasto), o ipersensibilità rettale. La stipsi può essere secondaria a un aumento delle contrazioni segmentali (non propulsive), HAPCs diminuite, o ridotta sensibilità rettale. Può essere documentato il transito intestinale del colon e del tenue ritardato in IBS-C e accelerato in IBS-D. Il dolore addominale può essere anche associato a HAPCs. Sono state osservate nell'IBS un maggiore incremento delle contrazioni fasiche dell'ileo terminale successivamente alla distensione, pasti grassi, e colecistochinina. La motilità colica può essere aumentata, ma questo incremento, sebbene maggiore rispetto ai controlli, non è specifico dell'IBS<sup>33</sup>; un maggiore aumento è stato osservato dopo la somministrazione di CRH (corticotropin releasing hormon), e questo aumento è ridotto dagli antagonisti del CRH.

B. **Ipersensibilità viscerale:** Negli anni '70, fu dimostrato che nell'IBS la distensione di un palloncino rettale provocava dolore a volumi minori rispetto ai controlli; questo è stato poi confermato da numerosi studi con l'uso dei palloni barostatici che controllano i cambiamenti della compliance, portando all'ipotesi che l'ipersensibilità colica sia un utile marker biologico di IBS. Questa osservazione viene interpretata come evidenza di un'alterata ed esaltata percezione di normali eventi fisiologici o sensazioni dolorose che avvengono nell'intestino in risposta, per esempio, all'ingestione di cibo, alla defecazione o alla presenza di gas intestinale<sup>34</sup>. L'ipersensibilità viscerale potrebbe spiegare il fatto che i pazienti con IBS sono più preoccupati, rispetto ai controlli, della presenza di gas e delle contrazioni intestinali dopo un pasto o stress. L'ipersensibilità viscerale non è un reperto universale nell'IBS e affligge circa il 60% dei pazienti. I neurotrasmettitori putativi che sono di rilievo nell'ipersensibilità viscerale sono la serotonina, le neurochinine, e il calcitonin gene-related peptide. La capsacina (contenuta nel peperone rosso) ha il proprio recettore sulle fibre nervose, anche chiamato *transient receptor potential vanilloid-1* (TRPV1), che appare essere aumentato nel colon rettosigmoideo nell'IBS e potrebbe mediare il dolore viscerale. Anche il recettore NMDA può essere importante dato che regola l'eccitabilità neuronale centrale (midollo spinale). Le proteasi seriniche sono state ipotizzate agire come molecole del segnale attraverso l'attivazione dei *proteinase-activated receptors* (PARs). Estratti derivati dalle biopsie della mucosa colica dei pazienti con IBS (ma non dei controlli) sono stati osservati sensibilizzare i nervi murini in coltura; ciò era bloccato da un inibitore delle proteasi seriniche. Un significativo aumento di tali enzimi è stato osservato nelle feci dei pazienti con IBS-D. Le proteasi seriniche potrebbero potenzialmente danneggiare le tight-junction e aumentare la permeabilità intestinale attraverso l'attivazione dei PARs. L'origine di queste proteasi ritrovate nelle feci è incerta, ma potrebbero derivare dai mastociti o dal microbiota intestinale<sup>35</sup>. Evidenze suggeriscono che nell'ipersensibilità viscerale presente in IBS ha un ruolo anche una disregolazione centrale. Segnali afferenti viscerali dall'intestino raggiungono il tronco encefalico e il talamo e sono percepiti consciamente solo occasionalmente, sebbene potrebbero esserci alcune registrazioni di segnali di bassa intensità<sup>36</sup>.

C. **Infiammazione ed alterata permeabilità:** Il normale intestino è in uno stato di infiammazione cronica che avviene a causa di un equilibrio tra gli organismi enterici commensali e le cellule del sistema immune dell'ospite, compresi i mastociti e i linfociti T attivati, che sono aumentati al di sopra dei livelli normali nella mucosa in sottogruppo di pazienti con IBS, suggerendo che potrebbe essere presente una patologia intestinale con infiammazione di basso grado<sup>32</sup>. Inoltre, è stata osservata nell'IBS un'importante infiltrazione linfocitaria del plesso mioenterico associata a una degenerazione neuronale, così come un aumento dei mastociti nella muscolare esterna. La causa di queste anomalie è sconosciuta ma infezioni, una flora batterica

anormale, o antigeni alimentari potrebbero tutti contribuire. Dal 7% al 30% dei pazienti che sono guariti da un episodio dimostrato di enterite batterica sviluppa IBS. Inoltre, i pazienti con un distress psicologico potrebbero quindi avere un aumentato rischio di IBS post-infettiva; in quei pazienti che la sviluppano, vi è un incremento dei linfociti T, CD3, CD4 e CD8, macrofagi e cellule enteroendocrine (enterocromaffini). I mastociti potrebbero giocare un ruolo centrale nell'IBS. I mastociti attivati rilasciano triptasi e istamina e sono stati osservati in stretta prossimità delle terminazioni nervose del colon in pazienti con IBS; questa scoperta è stata correlata con il dolore addominale. I supernatanti derivati da biopsie della mucosa colica dei pazienti con IBS si sono dimostrati in grado di eccitare i nervi sensitivi deputati alla nocicezione viscerale nel ratto, suggerendo che i mediatori dei mastociti, incluse la triptasi, l'istamina, e la prostaglandina E2, potrebbero rappresentare un altro meccanismo capace di indurre ipersensibilità viscerale nell'IBS<sup>37</sup>. L'infiammazione colica è associata alla produzione di numerosi e importanti mediatori inclusi la 5-idrossi-triptamina (5-HT) (serotonina), prostaglandine, bradichinine, adenosina, e *nerve growth factor*. Un anormale rilascio di 5-HT potrebbe avere un ruolo centrale nelle manifestazioni dell'IBS. Circa il 95% della 5-HT presente nel corpo è contenuta nell'intestino, in particolare nelle cellule enterocromaffini e nelle terminazioni nervose del SNE; è rilasciata a seguito di un aumento della pressione intraluminale, come dopo un pasto. La 5-HT agisce sui neuroni intrinseci primari afferenti nell'iniziare il riflesso peristaltico attraverso l'attivazione di vie eccitatorie ascendenti e vie inibitorie discendenti. Inoltre, nei pazienti con IBS è stato riscontrato un aumento della permeabilità intestinale, in particolare nel sottogruppo predominante IBS-D, nel post-infettivo, e nei pazienti con particolare ansia e depressione. Alcuni studi hanno dimostrato una significativa riduzione delle proteine delle TJ e dell'espressione dell'm-RNA della zonulina-1 in modelli sperimentali di IBS, insieme a un possibile coinvolgimento della Zonulina attraverso una *signaling* PAR2 mediato, nell'IBS-D.

D. **IBS e microbiota:** Molti degli studi disponibili dimostrano che i pazienti con IBS hanno una composizione del microbiota alterata rispetto agli individui sani, in particolare con un'abbondanza di Firmicutes insieme ad una riduzione di Bacteroidetes<sup>38</sup> sia in pazienti adulti che pediatrici. Inoltre, ci sono dati contrastanti riguardanti la differenza del microbioma nei vari sottotipi di IBS (a prevalenza di diarrea, IBS-D, a prevalenza di stipsi, IBS-C, non classificato, IBS-U), anche se il dato predominante sembra essere che non vi sia alcuna differenza di composizione in base al sottotipo di malattia<sup>39</sup>. In generale, i risultati degli studi in corso sul microbiota intestinale nei pazienti affetti da IBS mancano di consenso, sembra probabile che tali pazienti possano presentare un microbioma alterato, ma non è affatto chiaro se i cambiamenti dello stesso siano legati o meno ai sottotipi di IBS in base ai sintomi dominanti. Non è chiaro se la disbiosi sia la

causa o solo una conseguenza dell'IBS. I risultati degli studi su modelli animali supportano la seconda ipotesi. Ad esempio, la colonizzazione di topi *germ-free* con microbiota fecale disbiosico (con una maggiore concentrazione di Bifidobatteri e una riduzione di enterobatteri) prelevati da pazienti con IBS, è stata sufficiente a determinare un aumento di contrazioni addominali, un sintomo tipico, e a trasferire nei topi l'ipersensibilità alla distensione colica presente nei pazienti studiati. Questa osservazione conferma che l'intestino disbiosico dei pazienti con IBS contribuisce alla patogenesi della malattia<sup>40</sup>. La maggior parte degli studi finora pubblicati sulla flora intestinale di pazienti con IBS sono basati tuttavia esclusivamente sull'analisi del microbiota fecale, come *proxy* delle comunità microbiche intestinali, dimostrando, come già detto, una minore diversità microbica fecale nei pazienti con IBS rispetto ai soggetti sani<sup>41</sup>. Inoltre, *Simren et al.* hanno dimostrato che, tra i pazienti affetti da IBS con una composizione del microbiota alterata, un cluster presentava una maggiore diversità filogenetica, sia rispetto ad un altro gruppo di pazienti IBS sia rispetto ai controlli sani, inoltre era presente un ulteriore cluster di pazienti IBS caratterizzato da microbiota sovrapponibile a quello dei controlli sani<sup>36</sup>. È importante considerare ancora che fino ad ora pochi studi hanno confrontato il microbiota fecale con quello associato alla mucosa nello studio della sindrome dell'intestino irritabile<sup>42</sup>. Le differenze più importanti sono state riscontrate nei *phyla* che comprendono la più alta percentuale della flora intestinale, cioè Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria. Anche se le differenze nella composizione microbica delle feci e mucosale risultavano molto più pronunciate nei pazienti con IBS rispetto ai controlli sani, si potrebbe identificare un modello uniforme: i Bacteroidetes sono più abbondanti nel microbiota associato alla mucosa mentre i Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria dominano nelle feci. I batteri luminari sono coinvolti nei processi digestivi e nella modulazione del sistema immunitario dell'ospite tramite la produzione di specifici metaboliti e tossine. I batteri mucosali, d'altro canto, possono influenzare direttamente l'ospite tramite processi di interazione microbi-sistema immunitario. Inoltre, è stato anche descritto che vi sono differenze nelle capacità funzionali dei batteri a seconda della loro posizione all'interno del tratto gastrointestinale: i Bacteroidetes, insieme ai Firmicutes, costituiscono le due principali divisioni che dominano il tratto distale dell'intestino umano e costituiscono oltre il 90 % dell'intero microbioma, quindi, non è sorprendente che le principali differenze tra microbioma mucosale e fecale siano le variazioni delle specie batteriche che compongono queste due grandi divisioni. La rilevanza funzionale di questi due gruppi coinvolge diversi processi metabolici: un recente studio ha dimostrato la capacità di diversi Bacteroidetes e Firmicutes, vale a dire *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides fragilis*, *Parabacteroides distasonis*, *Eubacterium hallii* e *Clostridium bartlettii*, di sintetizzare fenilpropanoidi dalla conversione metabolica degli aminoacidi

aromatici come tirosina e triptofano. Alcuni di questi metaboliti sono associati positivamente all'omeostasi intestinale grazie alla loro capacità bioattiva di *scavenger* di radicali liberi e alla loro capacità di modulare la risposta infiammatoria. Sulla base di recenti evidenze, la particolare capacità dei Bacteroidetes di sintetizzare questi metaboliti e il loro predominio nel microbiota mucosale può essere di rilevanza per la regolazione delle risposte infiammatorie nel colon<sup>43</sup>, tuttavia la rilevanza clinica di queste evidenze ha ancora bisogno di ulteriori studi. In conclusione, la comprensione dell'importanza della flora intestinale nella generazione dei sintomi nell'IBS è in rapido aumento, le alterazioni nella composizione del microbioma intestinale sono considerate oggi un fattore verosimile nella generazione dei sintomi nei vari sottogruppi di pazienti. Ciò nonostante, a causa del fatto che l'eterogeneità dei pazienti è grande e che molti fattori esterni possono contribuire alla variazione del microbiota individuale, sono necessari studi accurati su larga scala per dimostrare più chiaramente il contributo delle alterazioni della flora intestinale al modello eterogeneo dei sintomi nei pazienti con IBS<sup>38</sup>.

### 3.3 Diagnosi di IBS

I sintomi dell'IBS possono imitare quelli associati a malattie organiche, ponendo una sfida per la diagnosi. I criteri di Roma IV aggiornati negli ultimi anni sono stati realizzati per facilitare la diagnosi dell'IBS, in base alla presenza di sintomi caratteristici e all'assenza di risultati obiettivi da un numero limitato di test diagnostici standard e di indagini<sup>44</sup>.

Recurrent abdominal pain, on average, at least one day per week in the last three months, associated with  $\geq 2$  of the following criteria:  
1. Related to defecation.  
2. Associated with a change in frequency of stool.  
3. Associated with a change in form (appearance) of stool.

**Tabella 2.** Criteri di Roma IV

Nei soggetti di età inferiore a 50 anni, con sintomi compatibili con i criteri diagnostici di Roma IV per IBS ed invariati da lungo tempo, con anamnesi familiare negativa per tumori o malattie infiammatorie intestinali, in assenza di segni di allarme, l'indagine diagnostica può essere limitata a esami di emocromo, sideremia, indici di flogosi, urine, feci e, per l'elevata prevalenza della malattia celiaca, alla valutazione degli anticorpi antitransglutaminasi o degli anticorpi anti-endomisio. Se questi esami risultano normali, è consigliabile prescrivere direttamente la terapia, rassicurando il paziente sul suo stato di salute. In questo modo gli esami più invasivi vengono limitati ai pazienti che, per vari motivi, risultano a rischio motivato di malattia organica e la terapia ha un ruolo nell'iter diagnostico perché usata come verifica indiretta della diagnosi. In soggetti nei quali, per età

o dati anamnestici, la presentazione clinica è dubbia, o nei quali non si ottiene una risposta terapeutica soddisfacente è utile intraprendere un algoritmo diagnostico guidato dal sintomo predominante.

### **3.4 Ruolo della dieta nell'IBS: patogenesi e terapia alimentare**

L'associazione tra l'assunzione di alimenti e l'induzione di sintomi gastroenterici e, meno comunemente, extra-intestinali è un concetto largamente accettato e dimostrato da innumerevoli studi<sup>45</sup>. Nei pazienti IBS spesso il cibo è considerato uno dei principali fattori precipitanti della sintomatologia: sebbene per anni la dieta sia stata valutata come avente un ruolo minore nella fisiopatologia di IBS, si ritiene che circa il 50% dei pazienti presenti un'esacerbazione dei sintomi immediatamente dopo l'ingestione di cibo<sup>46</sup>. Ciò trova fondamento nei profondi e complessi cambiamenti nella motilità e nella secrezione gastrointestinale e pancreatica, indotti dall'ingestione dei cibi. I processi fisiologici, a cui partecipano direttamente il sistema nervoso periferico (in particolare il nervo vago) e l'apparato endocrino, controllano la risposta del tratto gastrointestinale all'introduzione di cibo, consentendo una valida coordinazione tra le attività di propulsione, digestione, assorbimento dei nutrienti e la susseguente espulsione dei residui indigeribili. La risposta colica al pasto di questi pazienti, ovvero l'incremento della motilità intestinale dopo assunzione di cibo, è risultata aumentata<sup>47</sup>. Le alterazioni dei meccanismi di risposta al cibo, tipiche di questa sindrome, riguardano altresì alcuni ormoni che giocano un ruolo fondamentale nei processi digestivi dell'organismo: i livelli di motilina, grelina, colecistochinina e serotonina si presentano chiaramente mutati rispetto ai valori normali<sup>48</sup>. Numerosi individui affetti da IBS, dati i molteplici interrogativi sull'eziopatogenesi della sindrome e data la mancanza di un univoco piano terapeutico, nel corso degli anni si sono affidati a rimedi di dubbia provenienza, spesso consistenti in regimi alimentari a elevato rischio di deficit nutrizionali, a causa di un'errata imputazione del loro disturbo a presunte "allergie" e "intolleranze"<sup>49</sup>. Conseguentemente, negli ultimi anni si è cercato di far chiarezza su quali fossero effettivamente gli alimenti che maggiormente potessero essere considerati causa scatenante dei sintomi negli individui affetti da IBS. A tal proposito, nel 2001 uno studio svedese su un campione misto costituito da pazienti con IBS e individui sani ha messo in luce la correlazione tra flatulenza, meteorismo, dolore addominale e cibi ricchi in carboidrati e in grassi, caffè, alcol e spezie<sup>50</sup>. Particolare attenzione è stata rivolta a diete ricche di grassi. La digestione e l'assimilazione dei lipidi sono complesse e capaci di scatenare modeste reazioni nel tratto intestinale. Nonostante numerosi studi abbiano evidenziato la correlazione tra diete ricche di grassi e l'IBS, i tentativi svolti al fine di definire il reale contenuto di grassi nell'alimentazione dei pazienti hanno avuto scarsi risultati<sup>51</sup>. Conseguentemente, anche se molti

studi hanno dimostrato l'accentuazione della motilità colica dopo l'ingestione di lipidi, si sono presentate molte difficoltà nel tradurre queste evidenze in un beneficio clinico per i pazienti con IBS, tanto che la riduzione o l'eliminazione del consumo di questi alimenti dalla dieta non ha condotto a risultati soddisfacenti<sup>49</sup>. Poiché sono molte le somiglianze presenti tra IBS e celiachia negli anni è maturato il sospetto che il glutine, la sostanza scatenante la reazione immunologica e quindi i cambiamenti strutturali nell'intestino dei soggetti celiaci, sia implicato anche nella patogenesi dell'IBS<sup>49,52</sup>.

Un ulteriore aspetto da evidenziare per chiarire il rapporto tra il cibo e la sindrome dell'intestino irritabile è che, nonostante l'ampia varietà di alimenti ritenuti possibili concause nello sviluppo delle manifestazioni sintomatiche, vi è ormai la certezza che una dieta, sia nel breve, sia nel lungo periodo, modifichi significativamente il microbiota intestinale. Sono state documentate variazioni del microbiota in rapporto a particolari componenti della dieta (carboidrati non digeribili), in relazione alla somministrazione di antibiotici e all'ingestione di probiotici. Nell'IBS, le alterazioni del microbiota intestinale (disbiosi) svolgono un'azione importante sia sulla patogenesi, sia sull'aggravamento dei sintomi, in particolar modo di flatulenza e meteorismo<sup>53</sup>.

Consigli sui tempi e modalità d'assunzione del cibo sono indicati in ogni piano terapeutico per i pazienti con IBS, in particolare alcune norme dietetiche generali mirano a riequilibrare l'introito di fibre. I dati provenienti da trial controllati e randomizzati a disposizione, indicano che le fibre apportano un beneficio globale ed in particolare i supplementi di fibre sono spesso meglio tollerati rispetto alle fibre introdotte con l'alimentazione<sup>44</sup>. Le fibre non sono d'aiuto per il dolore, ma possono giovare alla stipsi di grado lieve e possono aumentare la consistenza delle feci. Il fattore chiave nell'assunzione dei supplementi di fibre è iniziare a basse dosi e incrementare molto gradualmente: questo riduce i problemi di un eccessivo meteorismo e dolore che sono tipicamente aggravate dall'aumentata assunzione di fibre<sup>49</sup>. Attualmente però, l'interpretazione riguardo i benefici clinici dati dalle fibre sta cambiando, in quanto, sebbene le fibre in generale aiutino a risolvere la stipsi, alcuni studi riferiscono al contrario un'esacerbazione dei sintomi, in particolare un aumento del gonfiore addominale in molti pazienti. Le più recenti meta-analisi hanno concluso che fibre solubili quali psillio e calcio polycarbophil hanno una reale efficacia nei pazienti con IBS-C, al contrario, fibre insolubili come la crusca sembrano incrementare il gonfiore intestinale<sup>54</sup>. Molti pazienti con IBS sospettano che un'intolleranza alimentare potrebbe essere rilevante per i loro sintomi: è utile determinare la quantità di latte o di prodotti caseari che vengano consumati per decidere se è sensato considerare i test per l'intolleranza al lattosio (deficit dell'enzima lattasi presente nel 50% della popolazione italiana).

Se le norme dietetiche di primo livello non danno sufficiente beneficio è consigliabile, in presenza di meteorismo e distensione addominale, prescrivere sotto controllo di un sanitario esperto nella gestione dietetica, una dieta a basso contenuto di FODMAPs (“Fermentabili Oligo-, Di- e Mono-saccaridi e Polioli”)<sup>55,56</sup>. I FODMAPs sono forme di carboidrati che, in soggetti predisposti, creano disturbi intestinali compatibili con l’IBS. I carboidrati incriminati sono: lattosio, fruttosio, fruttani, galattani e polialcoli (ossia sorbitolo, mannitolo, maltitolo, xilitolo e isomalto). Questo tipo di molecole sono scarsamente digeribili e/o assorbibili nel piccolo intestino. Il ridotto assorbimento può essere dovuto ai lenti meccanismi di trasporto attraverso l’epitelio intestinale (fruttosio), alla ridotta attività delle idrolasi sull’orletto a spazzola (lattosio), alla mancanza di idrolasi (fruttani e galattani) e alle discrete dimensioni delle molecole che non riescono a passare per semplice diffusione (polialcoli)<sup>55</sup>. Inoltre, sono molecole osmoticamente attive e pertanto vengono rapidamente fermentate dalla flora batterica e la velocità della fermentazione è influenzata dalla lunghezza della catena del carboidrato: oligosaccaridi e zuccheri semplici sono fermentati molto più rapidamente rispetto ai polisaccaridi. Il lattosio, se non scisso, viene fermentato dal microbiota intestinale con conseguente produzione di gas, causando crampi addominali, flatulenza, gonfiore e diarrea. Il fruttosio, se assunto in quantità significative, può eccedere la capacità del trasportatore, con conseguente malassorbimento e disturbi intestinali causati dalla fermentazione batterica a livello dell’intestino crasso. I fruttoligosaccaridi (FOS), i fruttani con un basso grado di polimerizzazione della catena e i galattani, sono osmoticamente attivi e rapidamente fermentabili, il che può determinare la comparsa di sintomi gastrointestinali indesiderati tra cui flatulenza, meteorismo, dolori addominali e diarrea. L’eccessiva assunzione di polialcoli (ossia sorbitolo, mannitolo, maltitolo, xilitolo e isomalto), può causare l’insorgenza di sintomi gastrointestinali paragonabili a quelli del malassorbimento del lattosio e fruttosio. L’assorbimento lento dei polialcoli può, con ogni probabilità, determinare il loro parziale malassorbimento con conseguente effetto lassativo se vengono consumati in quantità eccessive.

La dieta a basso contenuto di FODMAP o Low Fodmap Diet (LFD), rappresenta l’approccio nutrizionale maggiormente utilizzato negli ultimi anni nei pazienti con IBS. Si tratta di un modello dietetico che, non soltanto modifica le abitudini alimentari dei singoli individui, ma di fatto apporta dei notevoli cambiamenti positivi nella qualità della vita, migliorando e/o risolvendo le manifestazioni cliniche<sup>45</sup>. Tuttavia, una LFD senza un adeguato supporto del nutrizionista può determinare un minor apporto di fibre che può comportare un mutamento nella consistenza delle feci, che nei soggetti con IBS-C può non essere positivo. Inoltre, un’eccessiva restrizione dietetica attuata durante la prima fase della terapia, specialmente nei pazienti che non sono correttamente monitorati e seguiti da una guida nutrizionale idonea, può condurre il paziente a un’importante



perdita di peso, a uno squilibrio nutrizionale e alla riduzione sierica di Calcio e proteine. L'effettiva adeguatezza nutrizionale della LFD, in conclusione, sarà ancora per molto tempo oggetto di analisi e ricerca, in quanto, ad oggi, il reale rischio nutrizionale che può insorgere conseguentemente ad essa rimane ancora da chiarire<sup>57</sup>.

## CAPITOLO 4. MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI

### 4.1 Definizione e cenni di epidemiologia

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) sono patologie croniche e comprendono la Malattia di Crohn (MC) e la Colite Ulcerosa (CU). Nel corso degli anni sono state avanzate diverse ipotesi per cercare di spiegare l'eziologia e la patogenesi di queste malattie: agenti infettivi, alterazioni della permeabilità intestinale, alterazioni genetiche, alterazioni del microcircolo intestinale, ma nessuno di questi meccanismi ha avuto evidenze scientifiche conclusive. Attualmente, l'ipotesi maggiormente accreditata è che, in soggetti geneticamente predisposti, stimolazioni antigeniche ambientali e/o della flora intestinale possano determinare la perdita dei fisiologici meccanismi di controllo dell'infiammazione, con una produzione amplificata di citochine pro-infiammatorie e la conseguente perdita del normale equilibrio dei mediatori della flogosi a livello intestinale<sup>58</sup>. Rientrano quindi tra le malattie a patogenesi multifattoriale.

I dati relativi all'incidenza delle IBD variano sensibilmente in base alla regione geografica, all'ambiente e al gruppo etnico<sup>59</sup>. In passato la CU era considerata leggermente più frequente, ma questo trend sta cambiando con l'aumento della CD nelle ultime decadi. L'incidenza annuale di entrambe le patologie in Nord America si stima essere tra 0 e 20 casi per 100.000 persone<sup>60</sup>.

### 4.2 IBD ed ipotesi patogenetiche

L'eziologia delle IBD è tuttora sconosciuta, ma vi è accordo sull'ipotesi secondo cui, in individui predisposti geneticamente, fattori esogeni, quali fumo, ormoni ed enteropatogeni, come *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, ed endogeni, come la barriera enterocitaria e quella immunitaria innata ed adattativa, interagiscono causando uno stato cronico di alterata funzionalità dell'immunità mucosale, sulla quale intervengono ulteriori modificazioni ambientali che possono dare inizio alla malattia innescando una risposta infiammatoria che il sistema immunitario mucosale non sarebbe più in grado di controllare. Pertanto, il sistema immunitario nella patogenesi delle IBD ha un ruolo cruciale, ipotesi corroborata dal fatto che diverse analisi di linkage e studi di associazione *genome-wide* che si focalizzano sull'identificazione di polimorfismi del singolo nucleotide (SNP), hanno identificato circa 100 loci associati alle IBD localizzati su cromosomi diversi. Molti di questi sono risultati associati ad altre malattie immuno-mediate, lasciando intendere che le stesse vie immunogenetiche siano coinvolte nella patogenesi di differenti condizioni. Tra i geni coinvolti, rientrano i geni associati all'immunità innata e all'autofagia (per es. NOD2, ATG16L1), che intervengono nella risposta e nell'eliminazione di batteri, micobatteri e virus; geni associati all'attività del reticolo endoplasmatico e allo stress metabolico, che regolano

L'attività secretoria delle cellule coinvolte nelle risposte a microbi intestinali. In condizioni fisiologiche il nostro sistema immunitario non reagisce nei confronti del contenuto luminale grazie al fenomeno della *tolleranza orale*, che coinvolge diversi meccanismi, come l'eliminazione o l'anergia delle cellule T specifiche, oppure l'induzione delle cellule TCD4<sup>+</sup>, che sopprimono la flogosi intestinale e che secernono citochine antiinfiammatorie come l'IL10 e il TGFβ. La disregolazione di questo meccanismo può essere responsabile della perdita della tolleranza immunitaria agli antigeni alimentari e ai batteri commensali del lume intestinale. Nelle IBD evidenze scientifiche crescenti dimostrano che questo meccanismo risulta alterato, portando ad un'inflammation incontrollata, e che un ruolo primario in questo senso sia giocato dal microbiota intestinale<sup>61</sup>.

✓ **Microbiota e IBD: “dysbiosis hypothesis”:** Come già ampiamente descritto nel capitolo precedente, il microbiota umano svolge un ruolo cruciale nella regolazione della risposta immunitaria, poiché l'epitelio intestinale fornisce una barriera fisica, biochimica e immunitaria atta a segregare il lume intestinale dall'interno dell'organismo. Le IBD sono localizzate principalmente nelle aree dell'intestino dove si trovano la maggior parte dei batteri (tenue distale e colon) e la presenza della flora commensale si è dimostrata essenziale per lo sviluppo di colite sperimentale in diversi modelli animali di IBD<sup>62</sup>. La “*dysbiosis hypothesis*” afferma che l'alterazione e la diversità di composizione del microbiota intestinale, piuttosto che la presenza di agenti patogeni specifici, siano rilevanti nella patogenesi delle IBD, come dimostrato già dai primi studi degli anni '80, che utilizzavano la coltura batterica descrittiva e quantitativa classica e hanno definito questo concetto<sup>63</sup>. Ad esempio, nel 1988 Van de Merwe e colleghi hanno dimostrato che la flora fecale dei pazienti affetti da MC conteneva più bacilli coccoidi anaerobi gram positivi e bacilli Gram negativi, rispetto ai soggetti sani<sup>64</sup>. L'alterazione del microbiota intestinale nelle IBD è stata ben documentata, negli anni successivi, in molti studi provenienti da diverse parti del mondo, e, come già detto in precedenza, sembra essere influenzato molto anche da fattori ambientali, come ad esempio la dieta, ma anche le infezioni, gli antibiotici, il fumo, l'area geografica di provenienza e i servizi igienico-sanitari svolgono un ruolo fondamentale. Si ipotizza che le IBD possano derivare da perturbazioni nell'equilibrio tra microbiota enterica e/o inappropriata risposta immunitaria agli antigeni presenti nel microbiota intestinale in individui geneticamente predisposti<sup>62</sup>. Diversi studi recenti hanno rivisto le variazioni genetiche associate con il microbiota nelle IBD<sup>62,65</sup>: *pathways* chiave di rischio genetico nelle IBD includono difetti di riconoscimento (NOD2, TLR4)/clearance (geni-ATG16L1 autofagia, IRGM) del microbiota, la risposta immunitaria (innata o di adattamento) al microbiota (IL-23R, JAK2, TNFSF15), e/o la funzione di barriera della mucosa (come IBD5)<sup>62,65</sup>. Molti di questi polimorfismi genetici legati al microbiota hanno una grande rilevanza clinica,

in quanto sono stati associati ad un decorso più complicato di MC o CU. Fratelli sani di pazienti con MC presentano un fenotipo microbico alterato e profili immunitari associati alla malattia di Crohn, inoltre presentano un aumento della permeabilità della mucosa, che potrebbe promuovere la traslocazione batterica attraverso la mucosa intestinale, così come avviene nei pazienti con MC<sup>66</sup>. Uno studio del 2015 in pazienti con MC ha mostrato una significativa associazione tra NOD2 e una maggiore abbondanza relativa di Enterobacteriaceae a livello mucosale<sup>65</sup>. Inoltre anche l'apporto esogeno potrebbe influenzare la risposta genetica al microbiota: la vitamina D può direttamente indurre l'espressione di NOD2 e regolare l'attività del fattore nucleare NF-κB indotta dai batteri, pertanto, carenze di vitamina aumentano la suscettibilità allo sviluppo della malattia di Crohn<sup>67</sup>.

Come descritto in precedenza, il microbiota agisce in interazione con l'epigenetica, la genetica, e il sistema immunitario, ed è inoltre soggetto a modificazioni da parte di vari fattori ambientali, tra cui la dieta. Attraverso l'avvento di sofisticate tecniche di analisi del microbioma, indipendenti dai terreni di coltura (tra cui metabolomica e proteomica), sono stati identificate 10 alterazioni qualitative e quantitative nella composizione e nelle funzioni del microbiota intestinale nelle IBD, così come nelle interazioni tra flora intestinale e il suo ospite. Nonostante non sia ancora stato stabilito se queste alterazioni siano causa di disbiosi primaria (e quindi causale della reazione infiammatoria) o si verifichino come disbiosi secondaria (una volta che l'infiammazione è stata innescata, come una sua conseguenza), recenti studi favoriscono nettamente la prima ipotesi<sup>62</sup> e questo ha fatto sì che un'interessante nuova teoria prendesse piede ("*the bacterial penetration cycle*") che afferma che la malattia di Crohn deriva da una sequenza di eventi che comportano cambiamenti nella flora microbica e nella permeabilità intestinale, che portano all'adesione e penetrazione batterica a livello epiteliale, nonché alla successiva attivazione della risposta immunitaria adattativa, con consecutivo danno tissutale<sup>68</sup>.

La maggior parte degli studi suggerisce che una caratteristica comune del microbiota intestinale dei pazienti con UC e MC sia la diminuzione della varietà batterica, sia per quanto riguarda le specie batteriche sia per quanto riguarda la diversità, valutata in campioni fecali e mucosali, che presentano tra loro sostanziali differenze, essendo gli ultimi più importanti. Molte diversità sono state rilevate anche tra stato attivo e non attivo di malattia, così come tra le regioni intestinali infiammate e quelle risparmiate nei modelli animali. I pattern di disbiosi fino ad ora pubblicati non sono tuttavia coerenti tra gli studi scritti sull'argomento, forse anche a causa del prelievo di campioni in diverse fasi di malattia (talvolta influenzato da diete speciali e altre terapie), età diverse, popolazioni e aree geografiche, e differenti metodi utilizzati per l'analisi. Si ritiene che i primi cambiamenti siano più evidenti in malattie di nuova insorgenza e naïve nella popolazione

pediatrica rispetto a quella adulta, pertanto le forme di IBD in età pediatrica sono spesso considerate forme di malattia "pure" senza influenze di agenti esterni come il fumo o le comorbidità<sup>69,62</sup>.

Uno dei più ampi studi di coorte sul microbioma (447 bambini con MC e 221 controlli sani) ha recentemente confermato che l'infiammazione è fortemente associata con un calo complessivo della ricchezza di specie (diversità) e dell'abbondanza di alcune specie (*taxa*) nella mucosa<sup>69</sup>. I bambini con nuova diagnosi di MC presentavano un'aumentata abbondanza di Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*), Pasteurellaceae (*Haemophilus* spp.), Veillonellaceae, Neisseriaceae, Fusobacteriaceae, e Gemellaceae e diminuita abbondanza di Erysipelotrichaceae, *Bacteroidetes*, Clostridiales (compresi *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Blautia*, *Ruminococcus gnavus* e coppie, *Coprococcus*), e *Bifidobacterium*. Tuttavia, cambiamenti significativi del microbiota sono stati riscontrati prevalentemente nella flora batterica associata alla mucosa piuttosto che nei campioni di feci, suggerendo uno *shift* minore della disbiosi a livello del lume intestinale. A titolo di esempio, dei 4 gruppi tassonomici sopra menzionati, diminuiti nella MC, tutti tranne i *Bacteroidetes* risultavano significativamente aumentati nei campioni fecali; pertanto, secondo alcuni studi, la composizione del microbiota fecale non sembra essere un indicatore affidabile. Altro elemento importante è che la maggior parte delle alterazioni del microbiota riscontrate nella malattia di Crohn sono state confermate anche nella colite ulcerosa, in particolare i batteri la cui abbondanza risultava in significativo aumento. Nella coorte pediatrica inoltre la disbiosi mucosale ha mostrato una significativa correlazione positiva con l'attività clinica di malattia. (Disease Activity Index of Pediatric Crohn [PCDAI]) e negativa con la ricchezza di specie.

Anche in pazienti adulti, affetti da malattia di Crohn, è stato riscontrato un significativo aumento delle Enterobacteriaceae e una diminuzione dei *Bacteroidetes* e Clostridiales nel microbiota associato alla mucosa<sup>70</sup>. Altri studi condotti su pazienti con IBD (non al momento della diagnosi) hanno rivelato un'abbondanza complessiva ridotta di Firmicutes, così come una diminuzione della loro diversità nei campioni mucosali. In particolare i *clusters* di *Clostridium IV* (tra cui *F. prausnitzii*) e *XIVa* (come *Roseburia*) sono ridotti nella MC, mentre nelle feci, gli stessi gruppi di *Clostridium* sono meno rappresentati nei pazienti con IBD attiva (UC e MC) rispetto ai controlli sani<sup>71</sup>. La composizione del microbiota fecale in pazienti affetti da MC ha anche mostrato una diminuzione di *Dialister invisus*, una specie di *Clostridium* non caratterizzata del grappolo *XIVa*, di *F. prausnitzii* e *Bifidobacterium adolescentis*, e un aumento del *Ruminococcus gnavus* rispetto ai controlli<sup>72</sup>. Nella colite ulcerosa, i Firmicutes, in particolare *Clostridium coccoides*, risultavano ridotti sia a livello mucosale che fecale<sup>71</sup>, mentre il *F. prausnitzii* in un unico studio su pazienti con UC è risultato aumentato. In generale sembra che la riduzione dei *clusters* di *Clostridium IV* e *XIVa* sia molto importante, dal momento che mostrano attività immunologica protettiva, e funzioni legate

alla barriera mucosale e battericide che regolano l'omeostasi della mucosa: producono SCFAs e selettivamente richiamano le cellule  $T_{reg}$  che secernono citochine immunomodulanti<sup>73</sup>. Una diminuzione dei livelli di *F. prausnitzii* è considerato essere coinvolto in modo particolare nella patogenesi delle IBD, in quanto produttore di SCFAs, tra cui butirrato, e ha proprietà anti-infiammatorie ed immunomodulanti, infatti in modelli animali di colite *F. prausnitzii* è stato in grado di prevenire l'insorgenza di colite<sup>74</sup>.

✓ **IBD e permeabilità mucosale:** Non è ancora chiaro se l'infiammazione nelle IBD preceda la disfunzione della barriera epiteliale, come riportato in alcuni articoli o se, al contrario, la disfunzione della barriera sia una conseguenza dell'infiammazione cronica<sup>1,75</sup>. Indipendentemente da questi aspetti, è stato dimostrato che le interazioni molecolari di batteri invasivi aderenti, come *E. Coli*, con cellule epiteliali intestinali inducono risposte infiammatorie che portano alla sovrapproduzione di citochine proinfiammatorie<sup>76</sup>, che a loro volta determinano un'estensione delle lesioni intestinali locali. Questo fenomeno inoltre induce un sensibile aumento dell'espressione genica di NF- $\kappa$ B da parte delle cellule epiteliali, potenziando il circolo infiammatorio locale con ulteriore nuova produzione di citochine pro-infiammatorie come interleuchina IL-1b, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Questo profilo di citochine promuove anche la disregolazione delle TJ ed aumenta la permeabilità intestinale a seguito di una riorganizzazione interna delle proteine giunzionali come la Zonulina-1, JAM-A, occludina, claudin-1 e claudin-42<sup>76</sup>. Una conseguenza di tale danno all'integrità della barriera intestinale è ulteriormente esacerbato nelle IBD dal fenomeno della traslocazione batterica di un'elevata quantità endotossine batteriche circolatorie (come il lipopolisaccaride)<sup>1,76</sup>. A questi riscontri va aggiunto anche un rilievo di un'aumentata apoptosi cellulare negli epitelii intestinali nei pazienti affetti da IBD<sup>3</sup>. Diversi studi hanno dimostrato un aumento della permeabilità non solo nei pazienti con MC, ma anche in un sottogruppo di loro familiari di primo grado, rafforzando l'ipotesi che un aumento della permeabilità possa essere un fattore primario nella patogenesi della malattia che precede quindi lo sviluppo dell'infiammazione<sup>77</sup>. Nella pratica clinica, un aumento della permeabilità intestinale precede la fase di relapse nei pazienti affetti da IBD, suggerendo che un difetto dell'integrità mucosale è un evento precoce nell'esacerbazione della malattia.

Esiste una continua interazione tra la barriera intestinale e il microbiota, che ha un ruolo importante nel modulare la sua funzione, infatti vari studi su modelli animali indicano che il microbiota commensale influenza la regolazione della permeabilità paracellulare e del muco sovraepiteliale<sup>4</sup>.

Alcuni probiotici sembrano indurre dei cambiamenti nelle cellule della barriera intestinale, ad esempio alcune proteine prodotte da *Lactobacillus rhamnosus*, come P40 e P75 modulano la via di segnalazione di PI3K/AKT. Quando sono presenti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , questa proteina P40

insieme ad altre molecole stimola la produzione di Bcl2, andando a stabilizzare le tight junctions , promuovendo la funzione di barriera e la sopravvivenza cellulare<sup>78</sup>.

In conclusione, sono necessari ulteriori studi per migliorare la conoscenza dei meccanismi molecolari per chiarire se questi cambiamenti svolgono un ruolo primario nella patogenesi della malattia o se sono un effetto secondario in risposta all'inflammatione.

### 4.3 Aspetti clinici delle IBD

#### ✓ *Malattia di Crohn*

La diarrea cronica è il sintomo di presentazione più comune<sup>79</sup>, e una ridotta consistenza delle feci che dura più di 6 settimane è in genere adeguata per escludere una diarrea infettiva<sup>80</sup>. Ci possono essere anche presentazioni più acute, infatti un esordio acuto a livello dell'ileo terminale può essere confuso con un'appendicite acuta. I sintomi cronici e aspecifici invece possono mimare la sindrome dell'intestino irritabile, ma possono essere presenti altri elementi diagnostici utili come anemia e ritardo della crescita nei bambini<sup>79,81</sup>. Il dolore addominale e la perdita di peso vengono osservati rispettivamente nell'80% e nel 60% dei pazienti prima della diagnosi<sup>81</sup>. In circa il 50% dei pazienti si può ritrovare sangue o muco nelle feci che nella CU rappresenta il sintomo più frequente<sup>82</sup>. Talvolta possono insorgere delle manifestazioni extraintestinali della patologia prima che divengano rilevanti i sintomi intestinali, più comunemente si tratta di manifestazioni articolari<sup>83</sup>. Le fistole perianali sono presenti nel 4-10% dei pazienti al momento della diagnosi, e possono rappresentare il segno di esordio della patologia<sup>81</sup>.

#### ✓ *Colite ulcerosa:*

La presentazione clinica comprende molto spesso la rettorragia, presente nel 90% dei pazienti con UC attiva, e ci sono sintomi associati che in genere riflettono la gravità del danno mucosale e l'estensione di malattia<sup>82</sup>. La ridotta consistenza delle feci prolungata per più di sei settimane è un altro segno caratteristico, che la distingue dalle diarree infettive<sup>80</sup>. I pazienti con patologia attiva spesso presentano urgenza defecatoria, tenesmo, essudato mucopurulento, defecazione notturna e dolori crampiformi all'addome. I pazienti con proctite in particolare presentano rettorragia, tenesmo e urgenza defecatoria<sup>82</sup>. L'esordio della patologia è in genere insidioso, mentre nel 15% dei casi l'esordio è acuto con sintomi sistemici come febbre, perdita di peso, tachicardia, nausea, vomito. Le manifestazioni extraintestinali, specialmente le artriti assiali o periferiche, le episcleriti e l'eritema nodoso possono accompagnare la presentazione nel 10-20% dei casi, e talvolta possono precedere i sintomi intestinali<sup>83</sup>.

### 4.4 Diagnosi delle IBD

La diagnosi di Malattia di Crohn o Colite ulcerosa non ha uno standard rigidamente prefissato, ma richiede una combinazione di dati clinici, biochimici, endoscopici e istologici. Al momento della diagnosi ogni paziente dovrebbero essere sottoposto a delle analisi ematiche (emocromo, i markers infiammatori come la PCR, gli elettroliti, gli enzimi epatici) e analisi delle feci, per escludere patologie infettive come l'infezione da *Clostridium difficile*<sup>79</sup>.

✓ **Laboratorio:** Alcuni elementi laboratoristici che si possono riscontrare frequentemente sono l'anemia, la trombocitosi e la leucocitosi, la PCR elevata inoltre correla con la severità clinica della patologia. I markers di infiammazione possono comunque essere normali in queste patologie, la loro presenza non è specifica e non è utile a differenziare le differenti cause di colite. La calprotectina fecale, una proteina derivata dai neutrofili, sembra essere il marker più sensibile di infiammazione intestinale nelle IBD, i suoi valori inoltre correlano bene con gli indici endoscopici di attività di malattia e sono quindi utili sia nella valutazione iniziale della patologia che nella valutazione successiva dei relapse e della risposta alle terapie<sup>82,84</sup>.

✓ **Endoscopia:** Per ottenere una diagnosi affidabile di UC e CD è necessaria l'ileocolonscopia, con biopsie multiple prelevate dalle regioni coinvolte dalla patologia, e ulteriori biopsie provenienti da regioni non coinvolte (specialmente il retto nella CU)<sup>79,81,82</sup>.

✓ **Radiologia:** Le indagini radiologiche sono di grande utilità nella valutazione del piccolo intestino, infatti i pazienti con una nuova diagnosi di CD devono essere indagati attraverso indagini come la risonanza magnetica, l'ecografia o la videocapsula endoscopica. La TC e la RM sono entrambe valide tecniche per l'indagine dell'intestino tenue, e stimano l'estensione di malattia misurando lo spessore parietale e l'incremento del contrasto intravenoso. Queste metodiche hanno entrambe alta sensibilità e specificità, ma viene preferita la RM per l'assenza di radiazioni, specialmente dei pazienti giovani. L'ecografia dell'intestino tenue mediante contrasto orale (SICUS) ha trovato recente applicazione nel rilevare ispessimento delle anse ileali e nella valutazione della componente extraluminale delle lesioni<sup>79,85</sup>.

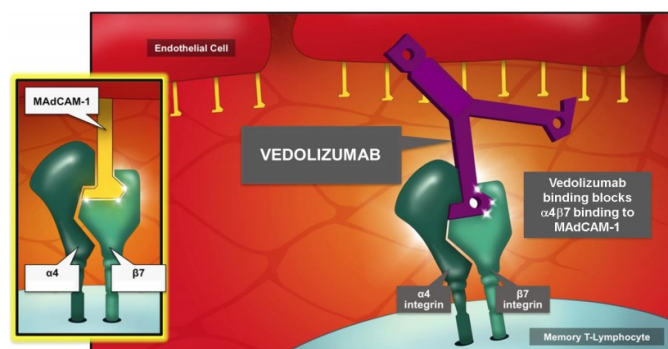
✓ **Istologia:** Nella MC l'infiammazione cronica (con un infiltrato composto da linfociti e plasmacellule) è focale e le caratteristiche microscopiche più tipiche sono la distorsione discontinua delle cripte e i granulomi. Nella UC, invece, la diagnosi microscopica è basata sulla presenza di caratteristiche come la diffusa distorsione delle cripte, l'atrofia della mucosa, l'infiltrato infiammatorio transmucosale con plasmocitosi basale e un'infiammazione attiva che causa criptite e accessi criptici<sup>79</sup>.

#### 4.5 Cenni di terapia nelle IBD



Le opzioni terapeutiche per la MC e la CU comprendono i corticosteroidi, i 5-aminosalicilati, le tiopurine, il methotrexate, inibitori della calcineurina e le terapie biologiche. La scelta tra le varie terapie dipende da svariati fattori come la localizzazione e la sede della patologia, la storia medica e chirurgica, l'età, le comorbidità, le manifestazioni extraintestinali, il costo e le linee guida locali. Al momento ci sono tre classi di farmaci biologici utilizzabili nel trattamento delle IBD, e sono gli antagonisti del tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), gli anti-integrine e gli inibitori delle interleuchine IL12/IL23. Non tutti i pazienti tuttavia rispondono ugualmente alle terapie, infatti il 20-30% dei pazienti non risponde dall'inizio del trattamento, mentre un ulteriore 30% ha una perdita di risposta nel tempo e diventa refrattario<sup>81,82</sup>.

❖ **Vedolizumab:** Tra I farmaci biologici attualmente approvati dall'FDA e dall'EMA per il trattamento delle IBD, l'antagonista del recettore dell'integrina  $\alpha 4\beta 7$  (Vedolizumab) è utilizzato dal 2014 sia per la forma refrattaria che per quella naïve della CD e UC, e ha mostrato una sicurezza ed efficacia elevate con un rapporto rischio-beneficio molto favorevole<sup>86</sup>. Il Vedolizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato che è in grado di bloccare il trafficking dei leucociti nelle IBD andando a neutralizzare selettivamente l'integrina  $\alpha 4\beta 7$ , prevenendo la sua interazione con MadCAM-1. MadCAM-1 è una proteina espressa soprattutto nelle cellule endoteliali intestinali, e inibendo questo legame Vedolizumab blocca la migrazione di un gruppo di linfociti T verso l'intestino infiammato (**Figura 6**). Questa specificità intestinale è un aspetto importante poichè in questo modo non si modifica lo spostamento dei linfociti verso altri siti, come ad esempio il sistema nervoso centrale, e quindi evitando il rischio di eventi avversi come ad esempio la leucoencefalopatia multifocale progressiva da JC virus osservata nel caso del Natalizumab<sup>86</sup>. Il valore farmacologico del Vedolizumab è stato dimostrato in tre trials clinici randomizzati e controllati (GEMINI 1, GEMINI 2, GEMINI 3), anche in pazienti con patologia moderata-severa che avevano fallito precedenti trattamenti immunomodulanti, come gli inibitori del TNF-  $\alpha$ <sup>87-89</sup>.



**Figura 6:** Meccanismo d'azione del VDZ

## PARTE SPERIMENTALE

### Capitolo 5. PROFILO DEL MICROBIOTA FECALE E MUCOSALE IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI, SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE E CONTROLLI SANI

#### 5.1 Introduzione

Nell'uomo, oltre 100 trilioni di microrganismi colonizzano il tratto gastrointestinale stabilendo relazioni reciproche con l'ospite. I dati metagenomici indicano che Bacteroidetes Gram-negativi (17-60%) e Firmicutes Gram positivi (35-80%) sono i phyla più predominanti negli individui sani<sup>90</sup>. I cambiamenti nelle specie batteriche, la cosiddetta disbiosi, con conseguente perdita dell'omeostasi intestinale, sono stati descritti in diversi disturbi intestinali, tra cui le malattie infiammatorie intestinali (IBD) e la sindrome dell'intestino irritabile (IBS)<sup>91</sup>. L'IBD, che consiste nella colite ulcerosa (UC) e nella malattia di Crohn (CD), è una malattia infiammatoria cronica gastrointestinale, recidivante-remittente, che si associa a vari gradi di danno intestinale e può favorire lo sviluppo di complicanze locali ed extra-intestinali<sup>92</sup>. L'incidenza e la prevalenza di IBD sono più elevate nelle nazioni occidentalizzate, con una prevalenza in Europa di 322 per CD e 505 per UC per 100.000 persone<sup>60</sup>. Sebbene la patogenesi delle IBD non sia stata completamente compresa, diversi studi supportano l'ipotesi che l'IBD si manifesti in soggetti geneticamente suscettibili a causa di una risposta immunitaria anomala alla flora batterica autologa in seguito all'esposizione a più fattori ambientali (Strober et al., 2007). È stato anche ipotizzato che una rottura dell'equilibrio tra le presunte specie protettive e le specie "dannose" potrebbe contribuire alla patogenesi della IBD<sup>93</sup>. Ad esempio, molti studi hanno documentato una riduzione della diversità e della ricchezza batterica nei pazienti con IBD, in gran parte a causa della diminuzione dei phyla Firmicutes e dell'aumento di Bacteroidetes<sup>94,95</sup>.

L'IBS è uno dei più comuni disturbi gastrointestinali funzionali in tutto il mondo, con una prevalenza del 10-15% nella popolazione generale<sup>31</sup>. L'IBS è caratterizzata da dolore addominale o discomfort, distensione addominale e alterazioni delle abitudini intestinali. Sempre più evidenze suggeriscono un ruolo importante del microbiota intestinale nella fisiopatologia dell'IBS. Tali evidenze sono supportate dall'osservazione che l'IBS può svilupparsi dopo una infezione intestinale e dall'efficacia dei probiotici nella gestione dei pazienti con IBS<sup>96,97</sup>.

Delucidazioni circa la composizione microbica, le analogie e le differenze della composizione del microbiota associato alla mucosa e quello fecale in pazienti affetti da IBD ed IBS rispetto ai controlli sani ed il ruolo delle varie specie batteriche che ne caratterizzano la disbiosi, sono rilevanti per comprendere le interazioni tra microbiota, processi metabolici e fisiopatologia

Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare se i pazienti con IBD e IBS presentassero cambiamenti specifici nella ricchezza e nella distribuzione del microbiota fecale e di quello associato alla mucosa, dell'uno rispetto all'altro e verso i controlli sani. Un obiettivo secondario è stato quello di individuare potenziali biomarcatori metagenomici per IBD e IBS, mediante confronto della composizione tassonomica.

## 5.2 Materiali E Metodi

Questo studio prospettico, multicentrico è stato condotto su pazienti con diagnosi di IBD o IBS rispetto a soggetti sani (CTRL), arruolati consecutivamente presso l'Unità di Gastroenterologia dell'Ospedale di Tor Vergata e il Dipartimento di Gastroenterologia dell'Università Campus Biomedico di Roma tra il 2015 e il 2017.

- **Popolazione dello studio:** Una completa valutazione demografica e clinica dei pazienti e dei controlli è stata eseguita da un gastroenterologo durante la prima visita di iscrizione. Di seguito i criteri di inclusione ed esclusione per i pazienti e i CTRL:

### a. Pazienti con IBD:

Criteri di inclusione: 1) diagnosi di IBD per almeno 3 mesi secondo la classificazione standard di Montreal (Satsangi et al., 2006); 2) pazienti con IBD con localizzazione colica o ileocolica; 3) pazienti di età compresa tra 25 anni e 60 anni.

Criteri di esclusione: 1) uso di antibiotici o altri supplementi batterici probiotici nei 3 mesi precedenti; 2) uso di farmaci antiinfiammatori non steroidei (FANS) nei 3 mesi precedenti; 3) ha riportato una diagnosi recente (meno di 3 mesi) di infezioni batteriche o parassitarie del tratto gastrointestinale.

### b. Pazienti IBS:

Criteri di inclusione: diagnosi di IBS eseguita utilizzando le seguenti procedure diagnostico-terapeutiche: valutazione clinica e esame sangue / feci; questionario dei disturbi funzionali intestinali, elaborato secondo i criteri di Roma IV (Lacy et al., 2016; Lacy and Patel, 2017); colonscopia (RSCS) con biopsie multiple.

Criteri di esclusione: 1) uso di antibiotici o altri supplementi batterici probiotici nei 3 mesi precedenti; 2) uso di FANS nei 3 mesi precedenti; 3) hanno riportato diagnosi recenti (meno di 3 mesi) di infezioni batteriche o parassitarie del tratto gastrointestinale, 4) grave malattia psichiatrica come problema clinico dominante, 5) altre gravi malattie e una storia di abuso di droghe o alcol.

### c. CTRL

Criteri di inclusione: 1) Soggetti asintomatici gastrointestinali (utilizzando un questionario per escludere le malattie croniche e tutti i sintomi gastrointestinali attuali); 2) fino a 60 anni sottoposti a colonscopia per lo screening del cancro del colon-retto; 2) assenza di lesioni macroscopiche (inclusa la presenza di diverticoli); 3) assenza di lesioni microscopiche evidenti sull'esame istologico di campioni di biopsia del colon prelevati durante la colonscopia. I criteri di esclusione di CTRL erano gli stessi descritti per IBS.

### **- Protocollo di studio e raccolta di campioni**

I pazienti arruolati sono stati sottoposti ad esame endoscopico completo del tratto digerente inferiore, dopo la preparazione con polietilenglicole (PEG) (4 litri) e dieta priva di scorie nei tre giorni precedenti l'endoscopia. Sono state raccolte biopsie mucose dal colon sigmoideo in tutti i pazienti con IBS e controlli per gli esami istologici di routine e per la valutazione del microbioma. Nei pazienti con IBD sono state raccolte biopsie dalla mucosa con lesioni per esami istologici di routine e valutazione del microbioma; nei pazienti con IBD con coinvolgimento del colon è stata prelevata una biopsia aggiuntiva da mucosa macroscopica, se applicabile, solo per la valutazione del microbioma, mediante campionamento del segmento sano del colon a monte. Tutti i pazienti hanno raccolto un campione di feci il giorno prima della preparazione con PEG. Tutte le biopsie e i campioni fecali sono stati immediatamente conservati a -80 °C, fino al trattamento per evitare rigorosamente l'esposizione dei batteri anaerobici all'ossigeno e per evitare la proliferazione batterica prima dell'estrazione del DNA. Tutti i pazienti sono stati arruolati dopo aver soddisfatto il consenso informato. Lo studio è stato eseguito in conformità ai principi della dichiarazione di Helsinki e approvato dal comitato etico locale (Protocollo di studio "Tor Vergata" General Hospital GR-2011-02350817 Registro degli esperimenti 44/15; Campus Prot. 24/15 PAR COMEt CBM).

### **- Estrazione del DNA, amplificazione per pirosequenziamento, analisi statistica**

Il DNA dei campioni di mucosa è stato automaticamente estratto dal biorobot EZ1 utilizzando il kit di tessuto EZ1 DNA seguendo le istruzioni del produttore (Qiagen, Germania). Il DNA fecale è stato estratto manualmente usando il kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Germania). Le regioni V1-V3 (520 bp) del locus RNA ribosomiale 16S sono state amplificate per il successivo step di pirosequenziamento su un 454-Junior Genome Sequencer (Roche 454 Life Sciences, Branford, USA), secondo la pipeline descritta in Ercolini et al.<sup>98</sup>. I primer sono stati codificati con codice a barre da 8 sequenze nucleotidiche uniche (Roche 454 Life Sciences, Branford, USA). Le reazioni a catena della polimerasi sono state eseguite utilizzando una Taq polimerasi Hi-Fi PCR (sistema FastStart™ High Fidelity PCR, dNTPack, Roche Diagnostics, Mannheim, Germania), garantendo elevata specificità, sensibilità e accuratezza durante

l'amplificazione PCR. Un primo filtraggio dei risultati è stato eseguito utilizzando l'elaborazione del segnale 454 Amplicon, quindi le sequenze sono state analizzate utilizzando il software QIIME 1.9.0<sup>99</sup>. Al fine di garantire un livello superiore di accuratezza in termini di rilevazione delle Unità tassonomiche operative (OTU), dopo la demultiplexing, le letture con un punteggio di qualità medio inferiore a 25, inferiore a 300 bp e con una chiamata ambigua di base sono state escluse dall'analisi. Le sequenze che hanno superato il filtro di qualità sono state escluse (Reeder e Knight, 2010) e singleton sono stati esclusi. Le sequenze vietate sono state controllate chimicamente da `identify_chimeric_seqs.py` usando gli approcci `Blast_fragments` e `ChimeraSlayer` ([http://qiime.org/scripts/identify\\_chimeric\\_seqs.html](http://qiime.org/scripts/identify_chimeric_seqs.html)). Gli OTU definiti da un 97% di somiglianza sono stati selezionati e le sequenze rappresentative sono state inviate a PyNAST per l'allineamento di sequenza<sup>99</sup>, e a UCLUST per il clustering di sequenze (Edgar, 2010). Il database per la corrispondenza degli OTU era greengenes (v 13.8). Dopo la rarefazione, il test della  $\beta$ -diversità con metrica UniFrac non ponderata è stato eseguito dal software QIIME

### **- Confronto della composizione tassonomica in base allo stato patologico di LEfSE per il biomarker metagenomico**

Dimensione dell'effetto dell'analisi discriminante lineare (LDA) (LEfSE)<sup>29,100</sup>, un algoritmo utilizzato per scoprire biomarcatori ad alta dimensionalità che caratterizzano le differenze tra condizioni biologiche, per identificare taxa che differivano in modo coerente tra tipi di campioni, è stato utilizzato per metagenomico scoperta di biomarker associata a IBD e IBS rispetto ai CTRL. LEfSe utilizza il fattoriale non parametrico Kruskal-Wallis test di somma-rango ( $\alpha = 0,05$ ) per identificare i taxa con abbondanze significativamente diverse tra le categorie, seguito da LDA per stimare la dimensione dell'effetto di ciascuna caratteristica dell'abbondanza differenziale. Le differenze di abbondanza sono state considerate statisticamente significative quando il punteggio LDA logaritmico era  $> 2,0$ . Se più varietà con differenti ranghi hanno mostrato importanza nello stesso taxon, le varietà con il punteggio più basso sono state considerate come responsabili.

## **5.3 Risultati**

### **- Popolazione dello studio**

In questo studio sono stati reclutati un totale di 129 pazienti come parte del progetto di ricerca (codice: WFR-GR-2011-02350817) finanziato dal Ministero della Salute (Italia). In particolare, 38 (29,5%) pazienti IBD del Dipartimento di Medicina e Gastroenterologia dell'Ospedale di Tor Vergata, 44 (34,1%) pazienti con IBS e 47 (36,4%) soggetti CTRL dell'Unità di Gastroenterologia dell'Ospedale Campus Bio-Medico (Roma, Italia) sono stati arruolati dal 2015 al 2017.

L'età media della popolazione in studio era di 51 anni (44-56) (p25 e p75, rispettivamente). I maschi rappresentavano il 48% della popolazione dello studio. Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con IBD e IBS e dei CTRL sono riportate nelle **Tabella 1#** e **2#**.

<b>IBD Patient Characteristics</b>	<b>IBD (N=38)</b>
<b>CD</b>	7
<b>UC</b>	31
<b>Age, Years median (range)</b>	48 (21-74)
<b>Sex, Male N (%)</b>	21 (55.2%)
<b>Smoking habits, N (%)</b>	
Yes	2 (5.3%)
No	36 (94.7%)
<b>Disease activity in UC patients, N (%)<sup>a</sup></b>	
Remission	3 (9.6%)
Mild	7 (22.6%)
Moderate	11 (35.6%)
Severe	10 (32.2%)
<b>Disease activity in CD patients, N (%)<sup>b</sup></b>	
Remission	2 (28.6%)
Mild	0
Moderate	3 (43.8%)
Severe	2 (28.6%)
<b>CD behaviour, N (%)</b>	
B1: inflammatory	2 (28.6%)
B2: Stricture	5 (71.4%)
B3: Penetrating	0
<b>CD location, N (%)</b>	
L1: Ileal	5 (71.4%)
L2: Colonic	1 (14.3%)
L3: Ileocolonic	1 (14.3%)
<b>UC location, N (%)</b>	
E1: Proctitis	2 (6.4%)
E2: Left-sided	14 (45.2%)
E3: Extensive	15 (48.4%)
<b>Endoscopist assessment of severity, N (%)<sup>c</sup></b>	
Mild	8 (21.1%)
Moderate	13 (34.2%)
Severe	17 (44.7%)
<b>Concomitant medication, N (%)</b>	
5-aminosalicylic acid or sulfasalazine	20 (51.6%)
TNFs alone	3 (7.8%)
Thiopurine alone	2 (5.3%)
Steroids alone	11 (28.9%)
Steroids plus anti-TNF	2 (6.4%)

**Tabella 1#.** Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti IBD

Subject Characteristics		IBS (N=44)	CTRLs (N=47)
	Age, Years median (range)	48 (28-59)	54 (50-59)
	BMI (mean)	24	23
Sex, N (%)	Male	14 (32)	27 (57)
	Female	30 (68)	20 (43)
Predominant Bowel Habit, N (%)	Diarrhoea	16 (36)	NA
	Constipation	18 (41)	NA
	Alternating	10 (23)	NA
Concomitant Therapies, N (%)	Antispasmodics	7 (16)	0
	Antidepressant	3 (7)	1 (2)
	Laxatives	8 (18)	0

NA= non applicabile

**Tabella 2#.** Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti IBS e controlli sani.

### - Campioni fecali e biopsie della mucosa

Un totale di 107 campioni fecali è stato incluso in questo studio e trattati: in particolare 30 da pazienti con IBD, 36 da pazienti IBS e 41 da CTRL (22 soggetti non hanno raccolto campioni fecali).

Un totale di 142 campioni biotici è stato ottenuto da 126 soggetti. Nello specifico, sono state raccolte 45 biopsie da CTRL, 44 da pazienti IBS e 53 da pazienti con IBD (37 da aree intestinali infiammate e 16 da aree non infiammate).

### - Composizione e distribuzione del microbiota fecale

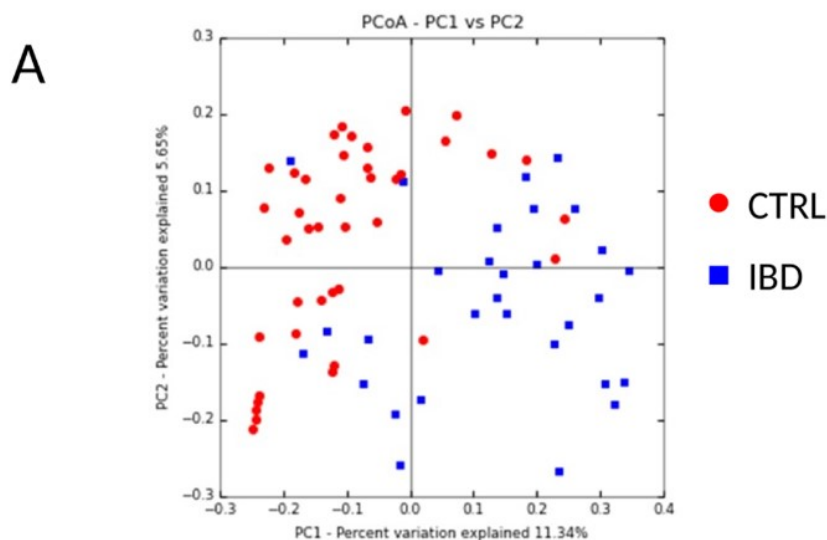
Un totale di 307.036.00 sequenze di letture sono state ottenute dai 107 campioni fecali, con un valore medio di 2.869 sequenze per campione. Le differenze di microbiota in IBD, IBS e CTRL sono state misurate dalle diversità  $\alpha$ - e  $\beta$ . Nei campioni di feci, la ricchezza di microbiota, basata sugli indici di Shannon e Chao I, era caratterizzata da una riduzione della diversità che andava dai CTRL all'IBS all'IBD (**Tabella 3#**).

Stool			Biopsy		
Shannon index					
Stool	Mean	p value	Biopsy	Mean	p value
<b>CTRL</b>	<b>5.14</b>	<b>0.000</b>	<b>CTRL</b>	<b>4.25</b>	<b>0.000</b>
<b>IBD</b>	<b>4.06</b>		<b>IBD</b>	<b>3.45</b>	
CTRL	5.14	0.284	CTRL	4.25	0.649
IBS	4.92		IBS	4.16	
<b>IBD</b>	<b>4.06</b>	<b>0.000</b>	<b>IBD</b>	<b>3.45</b>	<b>0.017</b>
<b>IBS</b>	<b>4.92</b>		<b>IBS</b>	<b>4.16</b>	
			IBD I*	3.05	0.878
			IBD NI*	3.16	
Stool			Biopsy		
Chao1 index					
Stool	Mean	p value	Biopsy	Mean	p value
<b>CTRL</b>	<b>365.05</b>	<b>0.012</b>	<b>CTRL</b>	<b>156.29</b>	<b>0.001</b>
<b>IBD</b>	<b>244.56</b>		<b>IBD</b>	<b>98.67</b>	
CTRL	365.05	0.108	CTRL	156.29	0.367
IBS	292.24		IBS	140.17	
<b>IBD</b>	<b>244.56</b>	<b>0.012</b>	<b>IBD</b>	<b>98.67</b>	<b>0.017</b>
<b>IBS</b>	<b>292.24</b>		<b>IBS</b>	<b>140.17</b>	
			IBD I*	103.98	0.221
			IBD NI*	67.83	

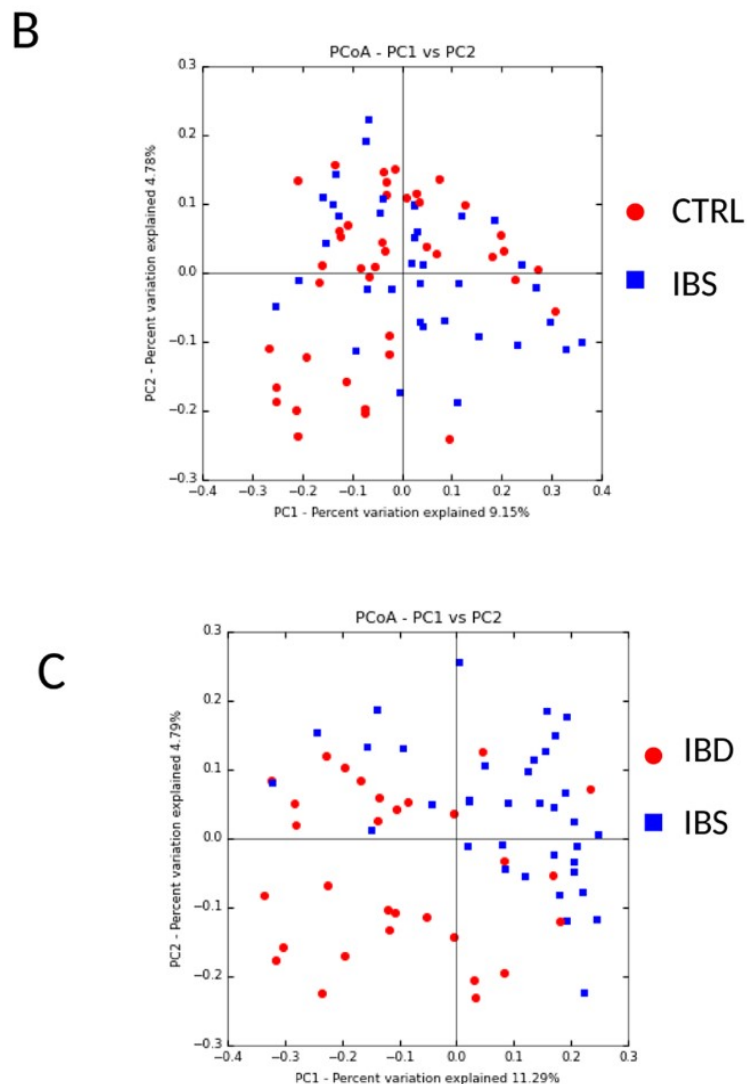
\*I, Inflamed; NI, Not Inflamed

**Tabella 3#.** Fisher's Least Significant Difference (LSD) test on  $\alpha$ -diversity indexes

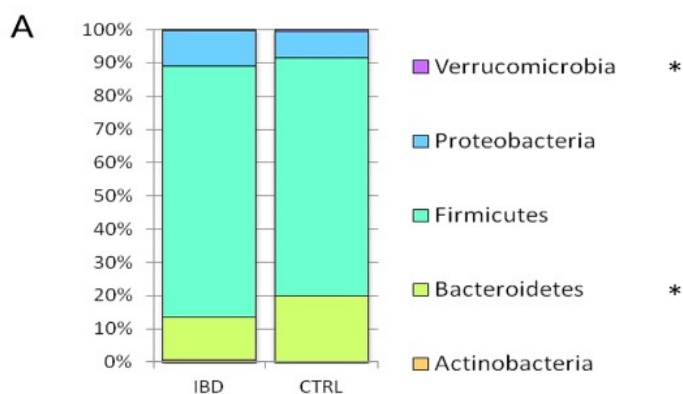
L'analisi della  $\beta$ -diversità ha mostrato una chiara separazione tra IBD e CTRL (PERMANOVA  $p = 0,001$ ) e tra IBD e IBS (PERMANOVA  $p = 0,001$ ) (**Figura supplementare S1, A e C**) con una separazione non significativa tra IBS e CTRL (PERMANOVA  $p = 0,13$ ) (**Figura supplementare S1, B**).

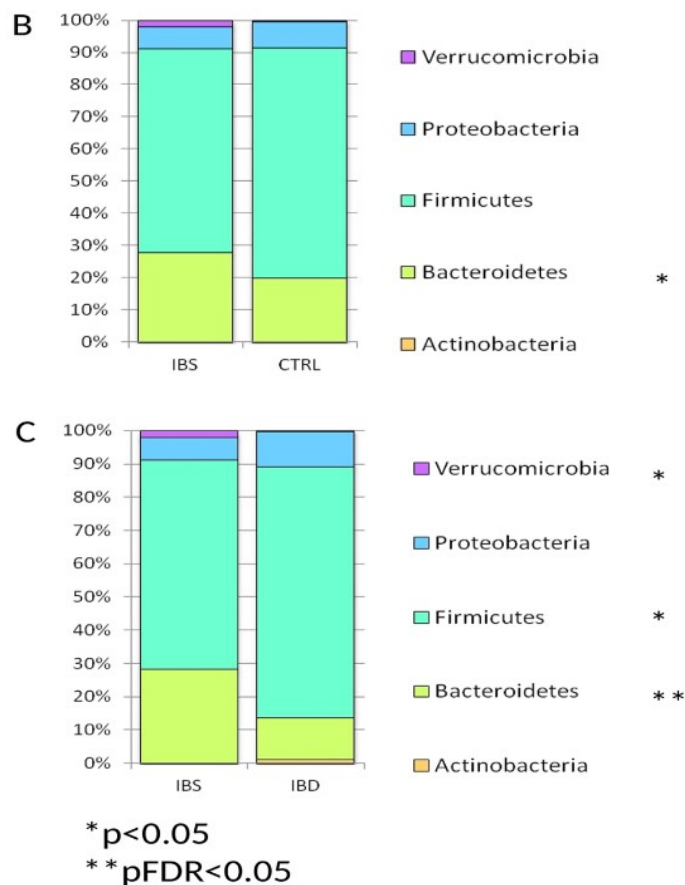






La distribuzione del phylum nell'IBD ospitava meno Bacteroidetes e Verrucomicrobia ( $p < 0,05$ ) rispetto ai CTRL (**Figura 1#, A**), mentre nei pazienti con IBS i Bacteroidetes apparivano aumentati rispetto ai CTRL ( $p < 0,05$ ) (**Figura 1#, B**). Confrontando i campioni IBS e IBD, è stato osservato un aumento significativo di Bacteroidetes ( $p\text{FDR} < 0,05$ ) e Verrucomicrobia ( $p < 0,05$ ) e una riduzione di Actinobacteria ( $p < 0,05$ ) nei pazienti con IBS (**Figura 1#, C**).

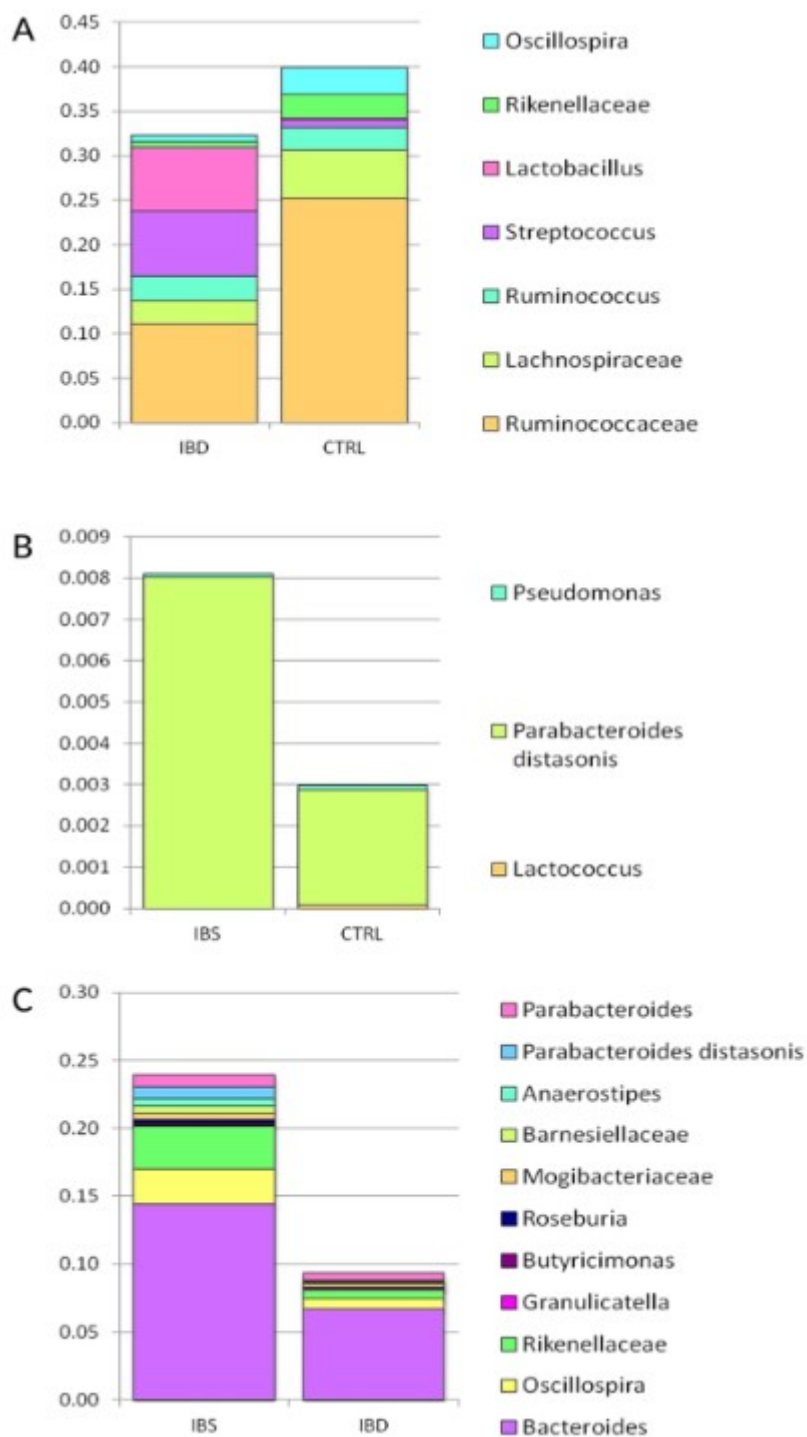




**Figura 1#.** Grafico a barre che riporta i risultati dei test di Kruskal-Wallis sugli OTU di distribuzione del phylum per IBD rispetto ai CTRL (A), IBS vs CTRL (B), IBD vs IBS (C), nei campioni fecali. Ogni colonna nel grafico rappresenta un gruppo e ogni colore nella colonna rappresenta la percentuale di abbondanza relativa per ciascun *phyla*.

Il test di Kruskal-Wallis ha mostrato che *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* erano significativamente rappresentati in IBD rispetto a CTRL (pFDR <0,05), mentre Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Rikenellaceae e *Oscillospira* erano sottorappresentate nell'IBD (pFDR <0,05) (**Figura 2#**, A). *Akkermansia muciniphila* è risultata in riduzione nei pazienti con IBD rispetto ai CTRL (pFDR <0,05).

Nei campioni IBS, *Parabacteroides distasonis* è risultato in aumento, mentre *Lactococcus* e *Pseudomonas* sono risultati ridotti rispetto ai CTRL (p <0,05) (**Figura 2#**, B). Confrontando i campioni IBS e IBD, *Bacteroides*, *Oscillospira*, Rikenellaceae, *Butyrivibrionaceae*, *Roseburia*, Mogibacteriaceae, Barnesiellaceae, *Anaerostipes*, *P. distasonis*, *Parabacteroides* erano più abbondanti negli IBS (pFDR <0,05) rispetto agli IBD, mentre *Granulicatella* era meno abbondante (**Figura 2#**, C). *A. muciniphila* è risultato ridotto in IBD rispetto a IBS (p <0,05).



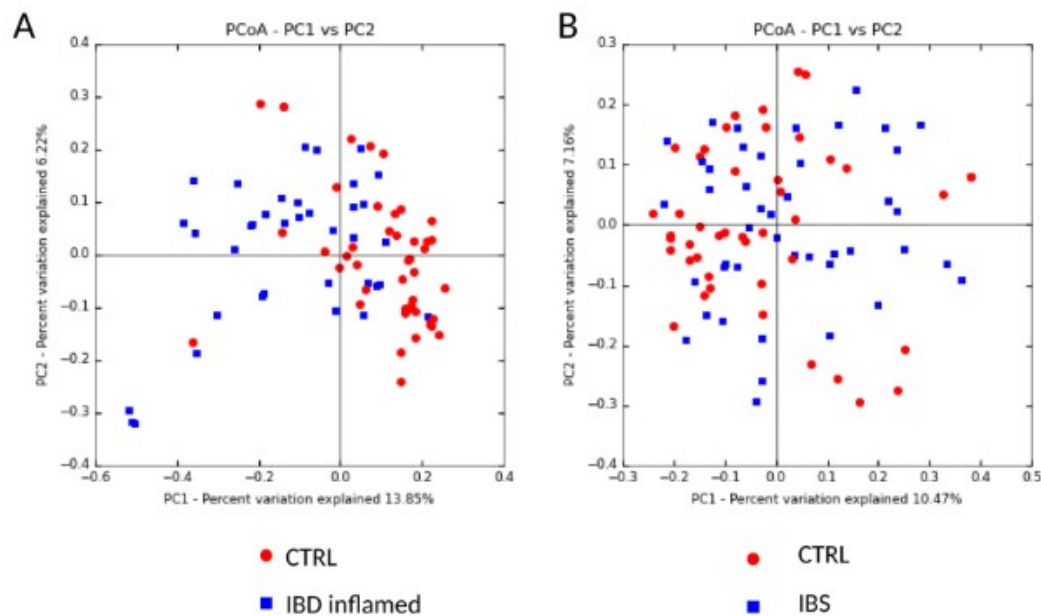
**Figura 2#.** Il grafico a barre riporta i risultati dei test di Kruskal-Wallis su OTU della distribuzione di genere/specie per IBD vs CTRL (A), IBS vs CTRL (B), IBD vs IBS (C), nei campioni fecali. Per il confronto tra IBD e CTRL (A), sono stati riportati solo OTU con pFDR <0,05 e abbondanza relativa > 0,01. Per l'IBS rispetto al CTRL (B) sono stati riportati solo OTU che hanno mostrato p <0,05. Per il confronto tra IBD e IBS (C), sono stati riportati solo OTU con pFDR <0,05

*Silvia Cocca*

## - Composizione e distribuzione del microbiota della mucosa.

130.330.00 sequenze di letture sono state ottenute da 142 campioni di mucosa, con un valore medio di 918 sequenze per campione.

Analogamente ai campioni fecali, l' $\alpha$ -diversità ha mostrato valori decrescenti da CTRL a IBS a IBD. Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i campioni di tessuto infiammato e non, nei pazienti con IBD (**Tabella 3#**). L'analisi della  $\beta$ -diversità ha mostrato una chiara separazione tra IBD (tessuto infiammato) e CTRL (PERMANOVA  $p = 0,001$ ) e tra IBD (tessuto infiammato) e IBS (PERMANOVA  $p = 0,001$ ) con una minore differenziazione tra IBS e CTRL (PERMANOVA  $p = 0,092$ ) (**Figura supplementare S2, AC**). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra campioni infiammati di IBD e tessuti non infiammati (valore  $p$  PERMANOVA = 0,94) (**Figura supplementare S2, D**).



*Silvia Cocca*

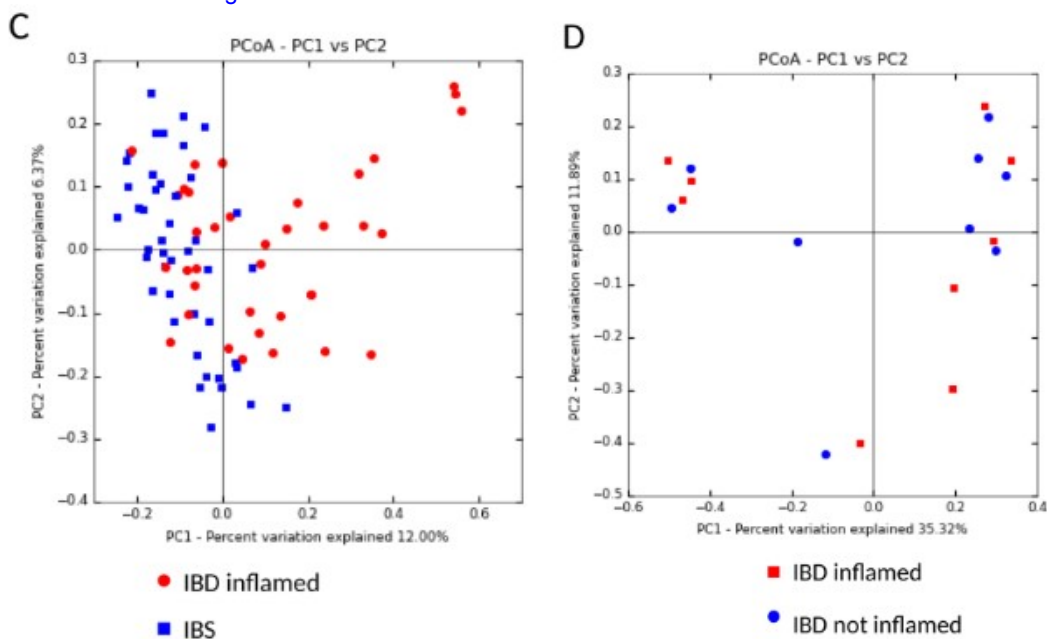
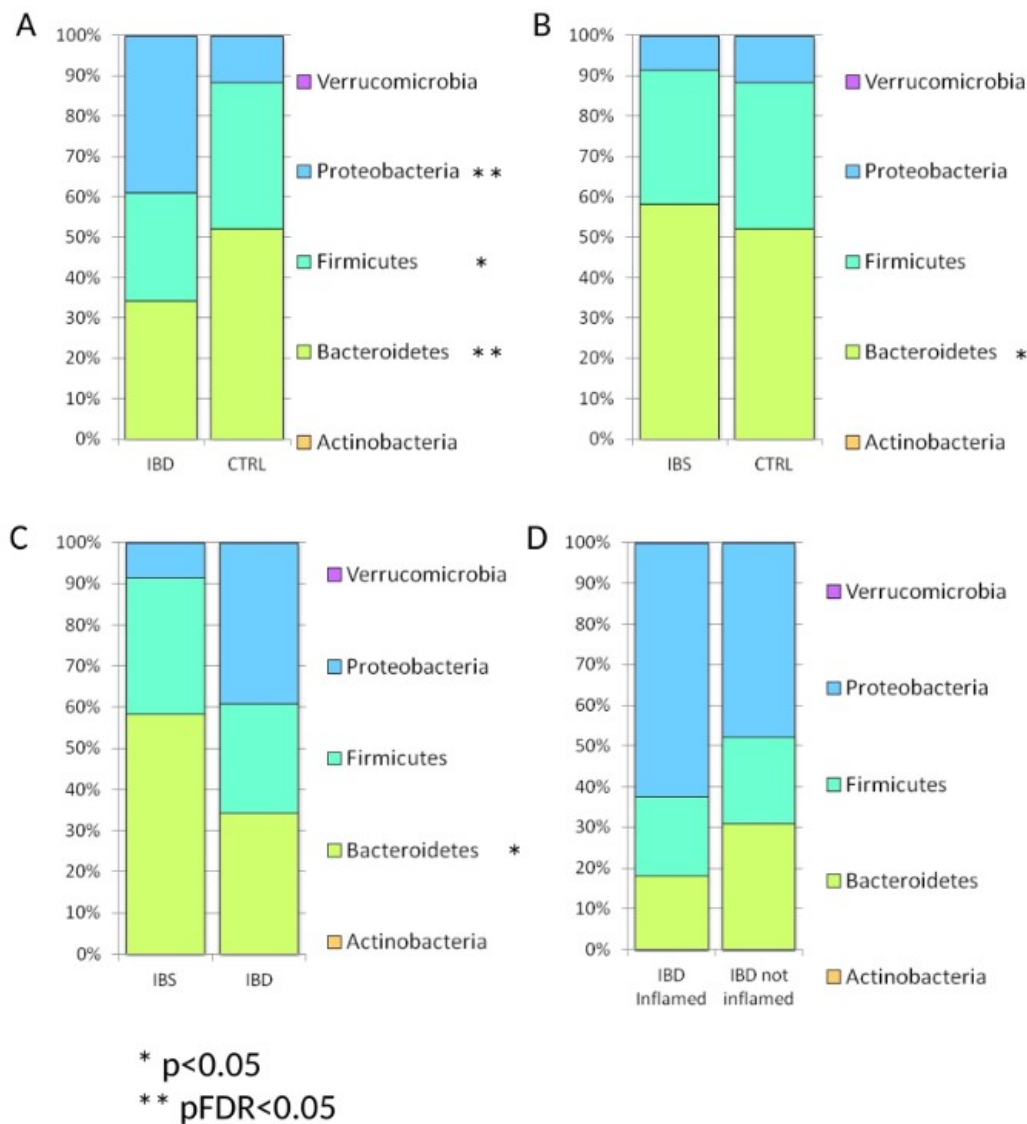


Figura supplementare S2. A, B, C e D

Il microbiota della mucosa infiammata dei pazienti con IBD ospitava più *Proteobacteria* (pFDR <0,05) e meno *Bacteroidetes* (pFRD <0,05) e *Firmicutes* (p <0,05) rispetto ai CTRL (**Figura 3#, A**). Negli IBS, i *Bacteroidetes* sono risultati aumentati rispetto ai CTRL (p <0,05) (**Figura 3#, B**) e confrontati con la mucosa infiammata dei pazienti con IBD (p <0,05) (**Figura 3#, C**). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata confrontando le biopsie prelevate dalla mucosa infiammata rispetto a quella sana (**Figura 3#, D**).

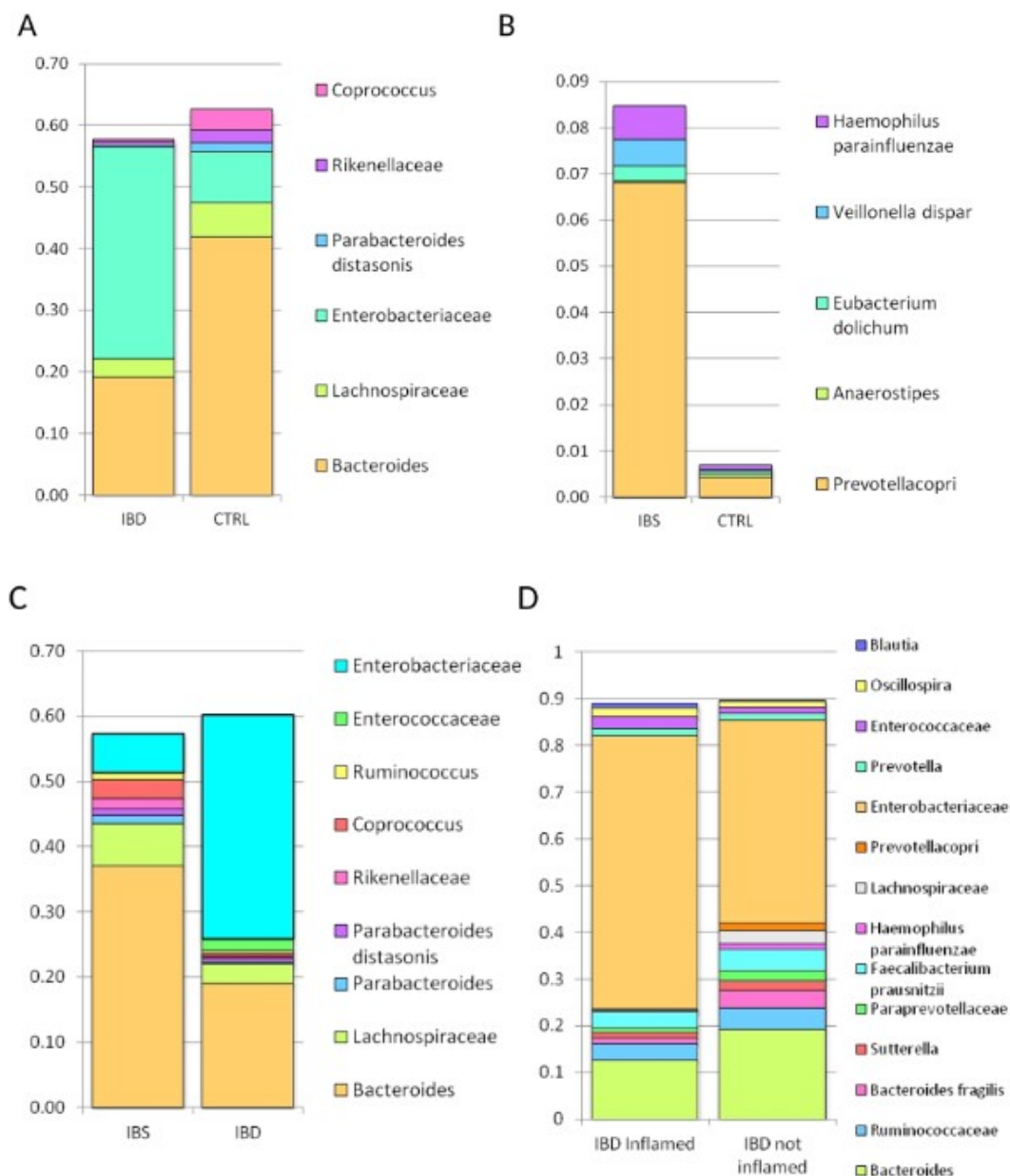


**Figura 3#.** Risultati dei test di Kruskal-Wallis sugli OTU mucosali di distribuzione del *phylum* per IBD rispetto ai CTRL (A), IBS vs CTRL (B), IBD vs IBS (C) e intra-individuale di mucosa infiammata vs mucosa senza segni di flogosi dei pazienti con IBD (D). Ogni colonna nel grafico rappresenta un gruppo e ogni colore nella colonna rappresenta la percentuale di abbondanza relativa per ciascun *phyla*. I valori p corretti per FDR sono stati evidenziati dall'asterisco.

A livello di genere/specie, un aumento di Enterobacteriaceae ( $pFDR < 0,05$ ) e una riduzione di *Bacteroides*, *P. distasonis*, Rikenellaceae, *Coprococcus* e Lachnospiraceae sono stati osservati nella mucosa infiammata dei pazienti con IBD rispetto ai CTRL ( $pFDR < 0,05$ ) (**Figura 4#, A**). Inoltre, anche *Faecalibacterium prausnitzii* e Ruminococcaceae sono risultati ridotti negli IBD ( $p < 0,05$ ). Un incremento di *Prevotella copri*, *Eubacterium dolichum*, *Veillonella dispar* e *Haemophilus parainfluenzae* e una riduzione di *Anaerostipes* sono stati riscontrati nei campioni di IBS rispetto ai CTRL ( $p < 0,05$ ) (**Figura 4#, B**). Nel confronto tra i campioni IBS e i campioni di mucosa infiammata degli IBD, *Bacteroides*, Lachnospiraceae, *Parabacteroides*, *P. distasonis*, Rikenellaceae, *Coprococcus* e *Ruminococcus* sono risultati aumentati nell'IBS, sebbene

Enterobacteriaceae, Enterococcaceae siano risultate ridotte negli IBS rispetto agli IBD (**Figura 4#, C**).

Il confronto intra-individuale tra i campioni biotici di mucosainfiammata e non infiammata dei pazienti con IBD è stato focalizzato solo sugli OTU con abbondanza relativa > 0,01. In questo confronto *Bacteroides*, Ruminococcaceae, *Bacteroides fragilis*, *Sutterella*, Paraprevotellaceae, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Haemophilus parainfluenzae*, Lachnospiraceae, *P. copri* erano diminuiti nella mucosa con flogi dei pazienti con IBD. Enterobacteriaceae, *Prevotella*, Enterococcaceae, *Oscillospira* e *Blautia* sono risultati aumentati negli IBD, anche se il valore p non era significativo (**Figura 4#, D**).



**Figura 4#.** Il grafico a barre riporta i risultati del test Kruskal-Wallis sugli OTU mucosali di distribuzione genere / specie per IBD infiammato rispetto ai CTRL (A), IBS versus CTRL (B), IBD infiammato versus IBS (C) e IBD infiammato versus non infiammato (D). Per l'IBD infiammato rispetto a CTRL (A) confronto sono stati riportati solo OTU che hanno mostrato pFDR <0,05 e abbondanza relativa > 0,01. Per l'IBS rispetto al CTRL (B) sono stati riportati

solo OTU che hanno mostrato  $p < 0,05$ . Per il confronto tra IBD e IBS (C), sono stati riportati solo OTU con  $pFDR < 0,05$  e abbondanza relativa  $> 0,01$ . Per le biopsie di aree di mucosa infiammata versus aree di mucosa sana dei pazienti con IBD sono state riportate solo OTU che mostravano un'abbondanza relativa  $> 0,01$ .

## - Confronto tra microbiota fecale ed associato alla mucosa

La  $\beta$ -diversità ha mostrato una netta distinzione tra i campioni di mucosa e di feci in tutti i gruppi. A livello di *phylum*, la distribuzione di Firmicutes e Actinobacteria è risultata aumentata, mentre Bacteroidetes e Proteobacteria sono risultati diminuiti nelle feci di tutti i gruppi ( $pFDR < 0,05$ , dati non mostrati). La Verrucomicrobia è risultata più abbondante nelle feci rispetto ai campioni di mucosa ( $pFDR < 0,05$  per CTRL e IBS). Considerando solo i campioni di feci, *Verrucomicrobia* era più abbondante nei campioni IBS.

La composizione del microbiota (filtrata per  $pFDR < 0,05$  e abbondanza relativa  $> 0,01$ ) ha mostrato un profilo simile nei CTRL e IBS sia nei campioni bioptici che in quelli fecali. Il modello IBD era caratterizzato da una composizione diversa e specifica. In particolare, nei CTRL e negli IBS, *Bacteroides* e Lachnospiraceae erano più abbondanti nei campioni di mucosa, mentre Clostridiaceae, *Oscillospira*, Ruminococcaceae e *Sutterella* erano più rappresentati nelle feci (Figura Supplementare S3; Tabella Supplementare S1). Nell'IBD, *Blautia*, Clostridiaceae, *Coprococcus*, Erysipelotrichaceae, *Lactobacillus* e *Streptococcus* erano più abbondanti nelle feci rispetto ai campioni bioptici di mucosa ( $p < 0,05$ ) (Figura supplementare S3).

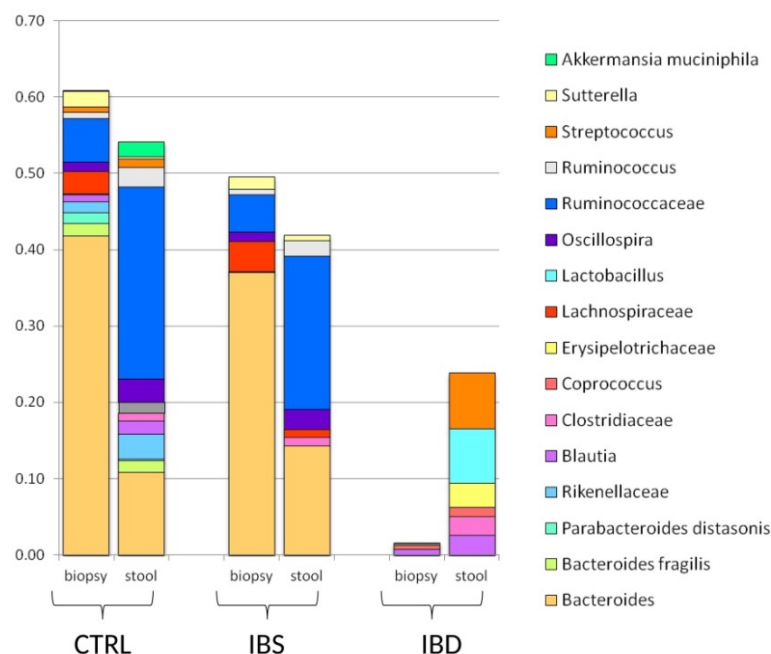
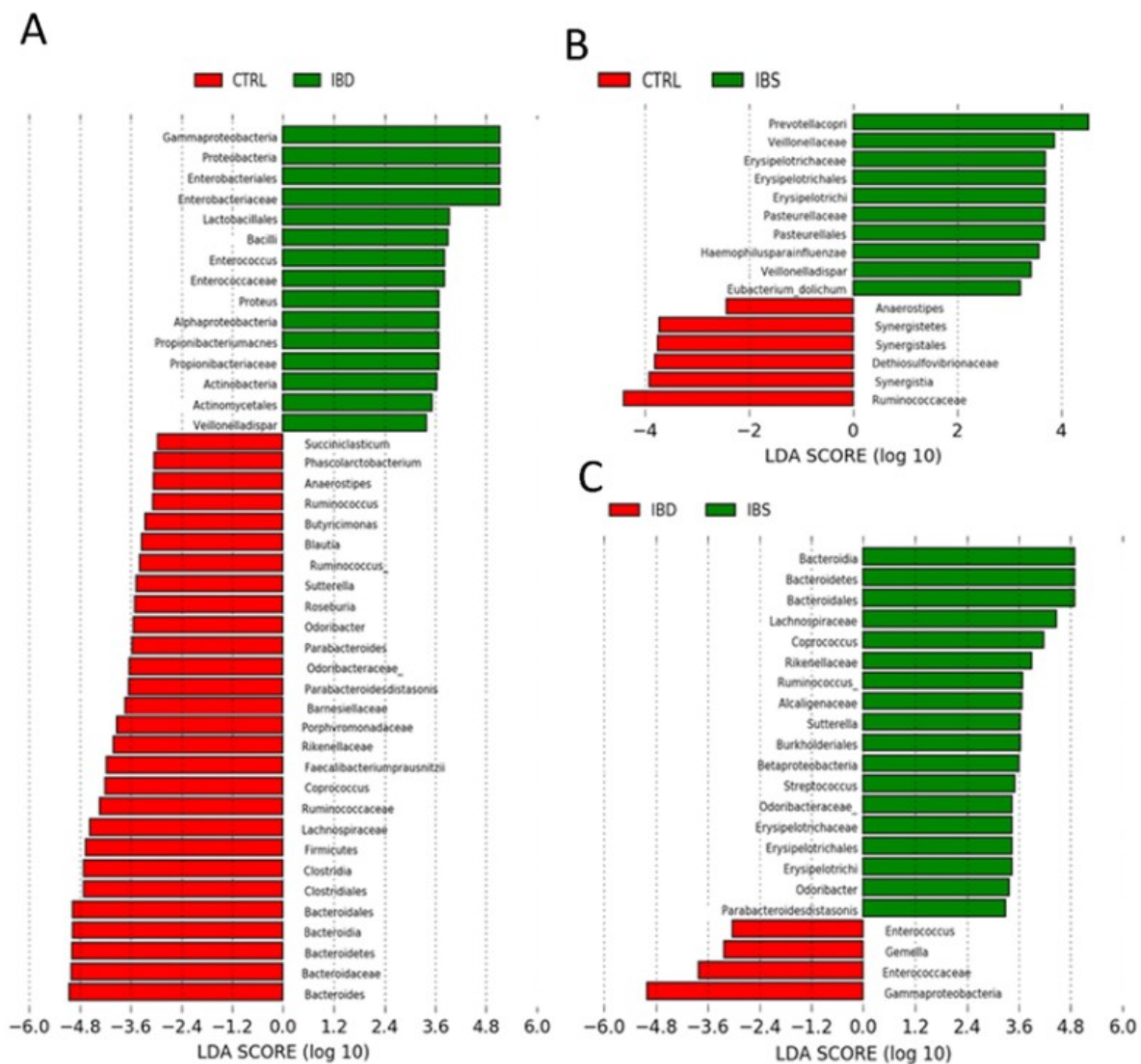


Figura supplementare S3



**- Confronto della composizione tassonomica in base allo stato patologico di LEfSE per il biomarker metagenomico**

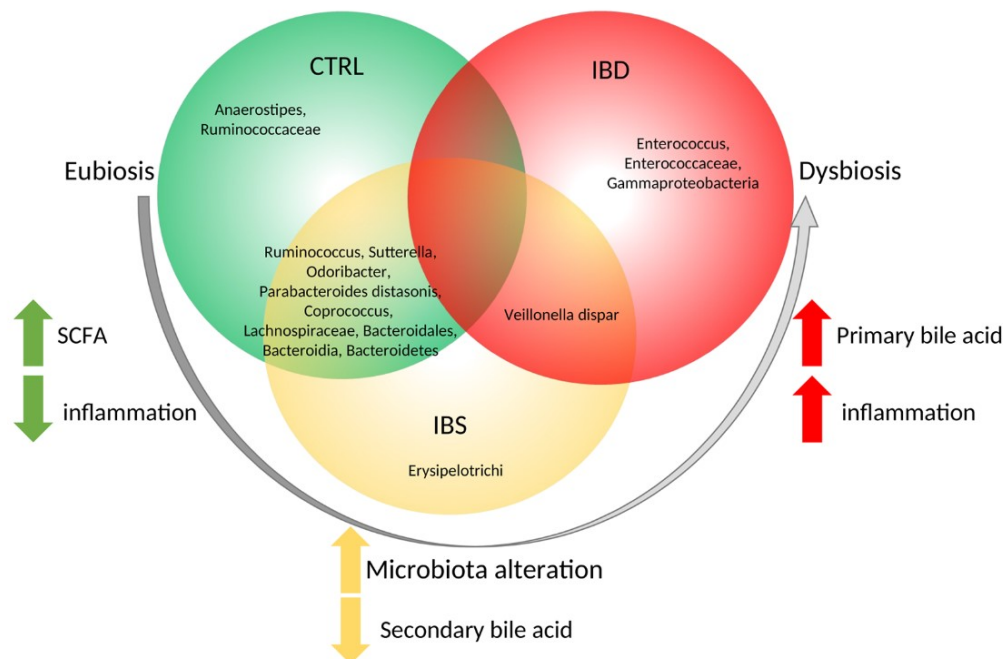
L'analisi LEfSE sulla composizione tassonomica comparativa di tutti i gruppi ha mostrato un numero maggiore di OTU nella coppia IBD / CTRL (**Figura 5#, A-C**).



**Figura 5#.** Biomarcatori OTU associati a gruppi IBS, IBD e CTRL. È stata eseguita un'analisi di dimensione dell'effetto discriminante lineare (LEfSe) (valore  $\alpha = 0,05$ , soglia del punteggio LDA logaritmico = 2,0). Nel pannello A, IBD vs CTRL; B, IBS vs CTRL; C, IBD vs IBS.

Considerando i risultati LEfSe, abbiamo selezionato gli OTU associati esclusivamente a ciascun gruppo, o condivisi tra diversi gruppi (Figura 6#). Gli *Anaerostipi* e le Ruminococcaceae sono stati identificati come potenziali biomarker per il microbiota CTRL, Erysipelotrichi per IBS e Gammaproteobacteria, *Enterococcus*, Enterococcaceae per IBD (Figura 6#). *V. dispar* è stato

identificato sia negli IBS che negli IBD, mentre *Ruminococcus*, *Sutterella*, *Odoribacter*, *P. distasonis*, *Coprococcus*, Lachnospiraceae, Bacteroidales, Bacteroidia, Bacteroidetes sono stati identificati nei CTRL e negli IBS.



**Figura 6#.** Modello descrittivo della composizione del microbiota e del suo ruolo a partire dall'eubiosi alla disbiosi. Il modello suggerisce che, in condizioni di eubiosi, specifici OTU compongono il microbiota e mantengono l'equilibrio. Un'alterazione del microbiota innesca l'infiammazione, portando ad un incremento di *Erysipelotrichi* e ad una riduzione della produzione secondaria di acido biliare. Quindi un ulteriore incremento dell'infiammazione porta ad un aumento dei produttori di bile primari con la conseguenza della disbiosi.

## 5.4 Discussione e Conclusioni

In questo studio il microbiota fecale e mucosale è stato caratterizzato, mediante analisi metagenomica basata sulle sequenze del gene 16S rRNA, in un'ampia coorte di pazienti affetti da IBS e IBD e confrontato con quello di controlli sani, in un periodo compreso tra il 2015 e il 2017.

In accordo con i dati presenti in letteratura<sup>101,102</sup>, l'analisi dei campioni fecali e mucosali ha evidenziato una progressiva riduzione sia della ricchezza che della diversità microbica nei pazienti affetti da IBS ed IBD, rispetto ai controlli sani. Tale alterazione è risultata direttamente proporzionale al progressivo aumento dell'infiammazione intestinale riscontrato nei pazienti affetti da IBS ed IBD. Infatti, l'analisi della  $\beta$ -diversità ha mostrato una divisione statisticamente significativa tra IBD e CTRL, nonché tra IBD e IBS. Al contrario non è stata trovata alcuna differenza statisticamente significativa tra IBS e CTRL.

Le alterazioni riscontrate nel profilo del microbiota a livello di *phylum* sono risultate simili confrontando IBD vs CTRL e IBD vs IBS. Inoltre, sono state osservate differenze meno evidenti tra

i CTRL e i pazienti IBS, in accordo con la letteratura<sup>92</sup>. Numerosi studi hanno dimostrato che nei pazienti affetti da IBD le alterazioni del microbiota intestinale sono molto frequenti. La maggior parte di essi, tuttavia, ha analizzato esclusivamente la composizione del microbiota fecale o mucosale separatamente, ma solo pochi hanno confrontato le due popolazioni batteriche<sup>103</sup>. Questo studio quindi contribuisce a chiarire meglio la differenza tra il profilo del microbiota fecale ed associato alla mucosa in pazienti con IBS e IBD.

Tra i risultati del presente studio vi è che nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nel confronto intra-individuale tra il microbiota mucosale di aree di mucosa infiammata rispetto alle aree di mucosa sana nei pazienti affetti da IBD. Diversi studi hanno anche tentato di stabilire se vi sia o meno una disbiosi localizzata nelle aree di infiammazione in questa categoria di pazienti e, in linea con i nostri dati, la maggior parte di essi ha suggerito che non vi è alcuna disbiosi localizzata<sup>104-108</sup>. Nel complesso, questi risultati non supportano l'ipotesi che l'infiammazione sia direttamente causata da un patogeno associato alla mucosa.

Per quanto concerne la caratterizzazione del microbiota fecale, nei CTRL, le specie più rappresentate sono risultate essere Ruminococcaceae, *Oscillospira* e Lachnospiraceae. Nei pazienti con IBS il microbiota fecale è stato caratterizzato dalla presenza di *Oscillospira*, che, curiosamente, è già stata descritta nella mucosa normale o in caso di lieve infiammazione<sup>108</sup>. Un tratto specifico del microbiota dei pazienti con IBS è stato l'aumento di *Parabacteroides*, *P. distasonis*, *Bacteroides* e *Rikenellaceae*; mentre i lattobacilli e gli streptococchi sono risultati presenti in modo significativo nei campioni fecali dei pazienti con IBD, suggerendo un potenziale ruolo patogeno di questi microrganismi nell'infiammazione intestinale.

I dati di questo studio hanno mostrato la riduzione di *A. muciniphila* nel microbiota fecale di pazienti con IBD, rispetto ai CTRL e IBS. In letteratura è stato riportato che questa specie esercita effetti benefici nell'ospite<sup>109,110</sup>, suggerendo quindi un ruolo protettivo di questa specie quando abbonda nella composizione del microbiota ed è stata trovata una correlazione negativa con IBD<sup>111,112</sup> e IBS<sup>113</sup>. Inoltre, in un modello animale con microbiota intestinale umano, è stato riportato che la presenza di questi batteri riduce i danni istologici colici e l'espressione di mRNA tissutale di mediatori pro-infiammatori<sup>113</sup>.

Osservando la composizione microbica della mucosa, sono stati osservati modelli simili sia nella mucosa dei CTRL che in quella degli IBS (rispetto a IBD) in termini di *Bacterius*, Lachnospiraceae e Coprococchi. Nel presente studio è stato evidenziato che *V. dispar*, *P. copri* e *Haemophilus parainfluenzae* risultavano significativamente rappresentati solo nel microbiota della mucosa dell'IBS. Riguardo a *V. dispar*, è stato generalmente considerato un batterio non patogeno, ma recentemente Kasai e collaboratori hanno suggerito un possibile ruolo di questo batterio

nell'infiammazione e nel cancro del colon-retto<sup>114</sup>. Invece, *P. copri* è stato correlato ad un'aumentata suscettibilità a disturbi infiammatori come l'artrite<sup>115</sup> e allo stato di infiammazione sistemica<sup>116,117</sup>. Questi batteri potrebbero essere coinvolti nella genesi dell'infiammazione lieve che potrebbe avere un ruolo nella patogenesi dell'IBS.

Una caratteristica peculiare del microbiota della mucosa dell'IBD è stata la presenza di *Enterobacteriaceae* e di Streptococchi che sono stati riscontrati in aumento sia nel microbiota fecale che in quello associato alla mucosa. L'interazione dei fattori di virulenza streptococcica con le cellule immunitarie potrebbe provocare una risposta infiammatoria in diversi organi<sup>118,119</sup>, indicando un possibile coinvolgimento di questo genere nello stato infiammatorio di IBD. Inoltre, studi precedenti hanno riscontrato un'elevata abbondanza di *Enterobacteriaceae* nei pazienti con CD<sup>120-123</sup>, a supporto dei nostri dati.

Un altro obiettivo di questo studio era identificare potenziali biomarcatori batterici associati al microbiota della mucosa nei pazienti con IBS e IBD. Nel modello proposto (**Figura 6#**), è stata riscontrata un'associazione esclusiva di *Anaerostipes* e Ruminococcaceae al microbiota dei CTRL. Il ruolo di questi batteri è probabilmente esercitato attraverso la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA)<sup>124,125</sup> che, com'è noto, svolgono un'azione protettiva della mucosa. È interessante notare che CTRL e IBS condividono la presenza di *Ruminococco*, *Sutterella*, *Odoribacter*, *P. distasonis*, *Coprococcus*, Lachnospiraceae e Bacteroidales che sono comunemente riconosciuti come commensali<sup>101,126</sup>. Infatti, Wang e colleghi<sup>127</sup> hanno correlato alti livelli di *Odoribacter*, *Sutterella*, *Coprococcus*, *Lachnospira* e *Ruminococcus* con il miglioramento dello stato di salute nei pazienti con CD, portando a supporre un ruolo positivo contro l'infiammazione intestinale.

*Erysipelotrichi* erano presenti esclusivamente in campioni di mucosa dei pazienti con IBS. Interessante è che la crescita eccessiva di diversi batteri come Erysipelotrichi è stata indotta, in un modello animale, dalla somministrazione di acido colico, che è stato riscontrato aumentato nei pazienti con IBS<sup>128,129</sup>. È stata riscontrata la presenza di *V. dispar* sia nel microbiota associato alla mucosa dei pazienti con IBS che con IBD. *V. dispar* ha mostrato la capacità di degradare il colato e il desossicolato in prodotti secondari<sup>130,131</sup>. L'associazione di questa specie ai pazienti con IBD e IBS suggerisce un ruolo di questi batteri nel dismetabolismo degli acidi biliari riportato proprio in questi gruppi di pazienti<sup>132</sup>. In realtà, nei pazienti con IBD è stata riportata una diminuzione degli acidi biliari secondari con una correlata perdita dei loro effetti anti-infiammatori, suggerendo quindi gli acidi biliari come attori importanti nei processi pro-infiammatori<sup>128</sup>. Infine, è stato riscontrato che *Enterococcus*, Enterococcaceae, Gammaproteobacteria sono esclusivamente presenti nei pazienti con IBD. È noto che *Enterococcus faecalis* era l'unico commensale umano a indurre

l'IBD<sup>133</sup>; e che i *Gammaproteobacteria*<sup>134</sup> (ad esempio, *E. coli* AIEC, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., e *Salmonella*) sono ridotti nella mucosa dei pazienti con IBD<sup>135</sup>.

In conclusione, questo studio fornisce una panoramica delle alterazioni del microbiota sia fecale che mucosale definendo possibili potenziali biomarcatori della mucosa in pazienti affetti da IBD e IBS. Ulteriori studi sono necessari per esplorare meglio la rilevanza dell'analisi microbica descritta, al fine di tradurre questi risultati preliminari nella pratica clinica.



## **CAPITOLO 6. CORRELAZIONE DEI DATI CLINICI E DELLA PERMEABILITA' INTESTINALE IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI IN TRATTAMENTO CON VEDOLIZUMAB**

### **6.1 Introduzione**

Diverse evidenze hanno dimostrato come l'alterazione della permeabilità mucosale sia alla base delle malattie infiammatorie croniche intestinali, e che questa correli anche con l'attività clinica della patologia<sup>136,137</sup>. Altri studi hanno mostrato che la terapia con anti-TNF è in grado di ripristinare l'alterazione della permeabilità e migliorare la condizione clinica del paziente, mentre rispetto al Vedolizumab questi dati sono ancora carenti<sup>138</sup>. È proprio su questi interrogativi che abbiamo deciso di rivolgere la nostra attenzione con questo studio, cercando di fare chiarezza su una patologia estremamente complessa e sugli effetti di questo differente approccio terapeutico.

Al momento non ci sono dati riguardo il possibile effetto del Vedolizumab sull'integrità dell'epitelio del colon, in termini di permeabilità al passaggio di ioni valutata attraverso la TEER, permeabilità paracellulare, *uptake* di batteri e modulazione del microbiota. Anche se già nella scorsa decade è stato indagato il legame tra alterazione della barriera intestinale e malattie intestinali, i meccanismi dettagliati che regolano questa relazione non sono conosciuti con precisione. Ad esempio, c'è una conoscenza limitata riguardo a cosa causi la disfunzione della barriera intestinale, cosa la prevenga o la ripristini. Nei pazienti con malattia di Crohn non è ancora chiaro se l'alterazione della barriera intestinale sia una causa o una conseguenza dello stato di infiammazione cronica intestinale<sup>138</sup>, ma la loro interdipendenza è un dato di fatto che va certamente indagato.

Inoltre, la maggior parte degli studi finora condotti in materia hanno utilizzato metodiche in vivo od in vitro per la valutazione della permeabilità intestinale, metodiche queste gravate da importanti *bias* metodologici ed operativi. Ad oggi, infatti, risultano limitati i protocolli sperimentali basati sull'utilizzo della Ussing Chamber, metodica ex vivo attualmente considerata il gold standard nella valutazione dell'integrità mucosale intestinale dei campioni biotici sia di soggetti sani che di soggetti malati

**Obiettivi dello studio:** Considerando queste premesse, si ipotizza che il Vedolizumab possa influenzare la barriera intestinale e contrastare il suo deterioramento nelle IBD. Quindi, al fine di valutare il possibile ruolo del Vedolizumab sulla barriera intestinale nelle biopsie del colon di pazienti affetti da IBD, sono state effettuate delle misurazioni elettrofisiologiche ex vivo, utilizzando la metodica delle Ussing chambers. Inoltre, sono state analizzate le possibili differenze dell'effetto del Vedolizumab sulla barriera intestinale di pazienti naïve e pazienti precedentemente

trattati con anti-TNF. Infine, sono state indagate le potenziali associazioni tra parametri clinici e alterazioni della barriera mucosale nei pazienti affetti da IBD, come obiettivo secondario dello studio

## 6.2 MATERIALI E METODI

### - Popolazione dello studio

Per la valutazione dell'integrità mucosale nelle IBD sono stati arruolati 23 pazienti affetti da IBD (19 UC e 4 CD) e 16 controlli sani asintomatici afferenti all'unità di Gastroenterologia del Policlinico Universitario Campus Bio-Medico di Roma tra il mese di Ottobre 2017 e il mese di Giugno 2020.

### - Pazienti

Venticinque pazienti affetti da malattia di Crohn o rettocolite ulcerosa (sia naïve che con risposta inadeguata ad un anti TNF-alfa o immunosoppressori) candidati a ricevere un trattamento con Vedolizumab, sono stati consecutivamente reclutati tra i pazienti afferenti alle unità di gastroenterologia del Campus Bio-Medico e dell'Azienda-Ospedaliera San Giovanni Addolorata di Roma.

Criteri di inclusione:

- Sottoscrizione di un consenso informato in forma scritta;
- Sesso maschile o femminile, con età compresa tra i 18 e gli 80 anni;
- Pazienti affetti da IBD con attività di malattia moderata-severa, la cui diagnosi sia stata definita attraverso criteri clinici, radiologici, endoscopici, candidati a ricevere un trattamento con Vedolizumab.

Criteri di esclusione:

- Uso di antibiotici nelle precedenti quattro settimane;
- Diarrea infettiva in corso;
- Localizzazione di malattia di Crohn nel tratto intestinale superiore, o precedente all'ileo, o pattern fistolizzante come unica indicazione alla terapia biologica;
- Uso di farmaci in grado di modificare la motilità e le secrezioni gastrointestinali (anticolinergici o procinetici);
- Recente uso di FANS;



- Donne in stato di gravidanza o allattamento, o potenziale gravidanza durante il corso dello studio.

## **- Gruppo di controllo**

Il gruppo di controllo consiste di 16 volontari sani, di età comparabile ai pazienti, che durante lo svolgimento di colonscopie di screening per il tumore del colon-retto, dopo aver firmato un consenso informato, hanno aderito al prelievo di 4 biopsie del colon-sigmoideo, sulle quali è stata valutata l'integrità della barriera intestinale.

Lo studio è stato effettuato in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki dopo approvazione del Comitato Etico Medico del Campus Bio-Medico.

## **DISEGNO SPERIMENTALE**

### **- Prelievo dei campioni biotici**

Dopo aver fornito il consenso informato, tutti i pazienti sono stati sottoposti ad una colonscopia per definire l'attività di malattia e per raccogliere le biopsie prima (T0), dopo 24 settimane (T1) e dopo 52 settimane di trattamento con Vedolizumab (T2).

Le colonscopie sono state eseguite dopo una preparazione a base di polyethylene glycol-electrolyte solution somministrata oralmente. Durante le procedure endoscopiche le biopsie sono state prelevate dalle aree di mucosa adiacenti le erosioni (ma risparmiate dall'infiammazione più intensa). Per ciascun paziente sono state prelevate 6 biopsie, di cui due sono state prelevate per le valutazioni istologiche, e quattro biopsie per lo studio della barriera intestinale. Durante la seconda colonscopia (T1) e la terza colonscopia (T2) in ogni paziente le biopsie sono state prelevate dagli stessi siti delle precedenti.

Le biopsie prelevate, non conservate in formalina, sono state immediatamente trasferite al laboratorio di ricerca dell'unità di Gastroenterologia del Policlinico Universitario Campus Bio-Medico di Roma e analizzate entro 30 minuti. I prelievi sono stati effettuati utilizzando pinze biotiche monouso.

### **- Analisi dei campioni biotici**

L'integrità mucosale delle biopsie coliche è stata analizzata all'interno delle Ussing Chamber misurando e comparando la permeabilità paracellulare alla fluoresceina isotiocianato-destrano (FD-4) e la resistenza elettrica transepiteliale (TEER) tra i 23 pazienti IBD e i 16 controlli sani. Quattro campioni biotici per ciascuno dei pazienti sono stati installati all'interno di una Ussing Chamber modificata da 3 ml (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) usando la tecnica precedentemente descritta da Wallon C, Braaf Y, Wolving M, et al<sup>139</sup>, esponendo una superficie di



0.017 cm<sup>2</sup>. Questa metodica ci ha permesso di misurare i due parametri sopracitati dell' integrità mucosale durante l'intero esperimento.

Brevemente, i compartimenti mucosale e serosale della Ussing Chamber sono stati riempiti rispettivamente con 3 ml da 10 mM di mannitolo e 10 mM di glucosio in soluzione Krebs-Ringer bicarbonato. Le soluzioni sono state conservate a 37°C e carbogenate in continuo con una miscela di O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%). L'esperimento è stato condotto in modalità "open circuit". Un *probe* paracellulare (FD-4, massa molecolare= 4000 Da, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) è stato poi aggiunto al compartimento mucosale e sono stati raccolti dei campioni dal versante serosale ogni 30 minuti per 2 ore e i cui livelli di fluorescenza sono stati misurati tramite un lettore di micropiastre a fluorescenza (Tecan Infinite M200-Pro multiplate reader, Tecan, Switzerland). I valori di fluorescenza registrati sono stati convertiti in concentrazioni di fluoresceina (pmol) usando una curva standard. Dal momento che il *probe* paracellulare richiede tempo per accumularsi sul versante serosale, i prelievi effettuati al tempo 0 e 30 minuti sono stati esclusi dall'analisi statistica. La media dei risultati ottenuti dai prelievi effettuati al tempo 60, 90 e 120 minuti relativi a ciascun campione biotipico è stata calcolata, e il rispettivo passaggio di FD-4 è stato ricavato ed espresso in pmol. La resistenza elettrica transepiteliale (TEER) è stata calcolata dalla deflessione del voltaggio indotta da un impulso bipolare di corrente costante da 16 mA ogni 60 secondi e dalla durata di 200 ms ed è stato registrato ogni 30 minuti per 2 ore. La media dei valori di TEER ottenuti a ogni prelievo (da 30 a 120 minuti) per ciascuno dei 4 campioni biotipici è stata calcolata e i risultati sono stati espressi in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Ogni esperimento è stato eseguito in quadruplicato.

#### **- Valutazione clinica**

Come previsto nella gestione di questi pazienti, le visite di controllo sono state effettuate al tempo zero, dopo due settimane e dopo 6 settimane nel periodo di induzione, e ogni otto settimane durante il regime di mantenimento, fino alla ventiquattresima settimana. Gli esami ematici e fecali, tra cui la proteina C reattiva, oltre agli score clinici come HBI e Partial Mayo Score Index sono stati eseguiti durante la valutazione iniziale e successivamente alla sesta e ogni otto settimane. L'efficacia è stata valutata all'inizio, alla settimana 24 e alla settimana 56, utilizzando l'Harvey-Bradshaw Index – HBI per la CD e il Partial Mayo score Index per la UC. La risposta clinica viene definita come un  $\Delta\text{HBI} \geq 3$  rispetto all'inizio nella CD e  $\geq 2$  punti per la UC, mentre la remissione viene definita come HBI <5 e Partial Mayo score index <2<sup>81,82</sup>. Per scopi di ricerca, la valutazione endoscopica con biopsie multiple è stata effettuata dopo 24 settimane e dopo 56 settimane di

trattamento con Vedolizumab, valutata con il Simple Endoscopic Score-Crohn Disease (SES-CD) per la CD e con il Mayo Endoscopic Score per la UC<sup>81,82</sup>.

#### - Analisi statistica

Per quanto riguarda l'analisi statistica dei risultati sperimentali ottenuti con le Ussing Chamber, questi sono stati raccolti ed elaborati attraverso il software statistico GraphPad Prism versione 8.4.2 (GraphPad, San Diego, California, USA). La correlazione tra i valori di permeabilità e i dati clinici è stata effettuata attraverso delle regressioni lineari. I valori relativi alla funzionalità della barriera intestinale in termini di TEER e passaggio di FD-4, misurati tra i differenti gruppi di pazienti, sono stati analizzati attraverso il Mann-Whitney test per dati non appaiati e il Wilcoxon test per dati appaiati. Il confronto tra i valori clinici registrati al tempo 0, al tempo 1 e al tempo 2 è stato effettuato con il Wilcoxon test per dati appaiati.

### 6.3 RISULTATI

#### - Caratteristiche dei pazienti

Il nostro studio sperimentale ha coinvolto un totale di 39 soggetti, di cui 23 pazienti affetti da IBD e 16 controlli sani. Il rapporto uomo/donna nei due gruppi era pari a 3:2 e 1:3 rispettivamente, con un'età mediana dei due gruppi di 47,7 e 53,6 anni. Solo 5 pazienti su 23 del gruppo IBD e un paziente su 16 del gruppo dei controlli ha dichiarato un'abitudine tabagica.

Le caratteristiche cliniche e demografiche dei due gruppi sono riassunte nelle seguenti tabelle (**tabella 1**, **tabella 2**, **tabella 3**).

	PAZIENTI		CONTROLLI
Genere (uomo/donna)	14/9		4/12
Età media	48,6		51,7
Abitudine tabagica	5 fumatori, 4 ex fumatori		1
Tipo di patologia	4 CD	19 UC	Nessuna

**Tabella 1:** caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti

I pazienti affetti da IBD sono in totale 23, di cui 4 affetti da malattia di Crohn e 19 affetti da Colite ulcerosa. La localizzazione di malattia è variabile, infatti sono presenti tra i pazienti affetti da colite ulcerosa 13 con pancolite e 5 coliti sinistre, mentre nei pazienti affetti da malattia di Crohn la localizzazione è in 2 casi ileo-colica, in un caso ileale, e in un caso colica. I pazienti sono sottoposti a differenti trattamenti concomitanti, la maggior parte di loro assume 5-ASA (21 pazienti), in 15 assumono corticosteroidi, in 2 salazopirina e in 2 azatioprina. In 10 pazienti si ritrova una

precedente esposizione a farmaci biologici, prevalentemente Infliximab, prima dell'inizio del trattamento con Vedolizumab iniziato con l'arruolamento in questo studio.

CARATTERISTICHE	NUMERO DI PAZIENTI INTERESSATI
<b>CD</b>	4
<b>UC</b>	19
<b>Attività di malattia nei pazienti CD (HBI), al T0</b>	
Remissione (HBI inferiore a 5)	2 (50%)
Leggera (HBI compreso tra 5 e 7)	2
Moderata	0
Severa	0
<b>Attività di malattia nei pazienti UC (Mayo Partial score), al T0</b>	
Remissione (minore di 2)	1
Leggera (tra 2 e 4)	10
Moderata (tra 5 e 7)	6
Severa (superiore a 7)	1
<b>Localizzazione di malattia nei pazienti CD</b>	
Ileale	1
Colon	1
Ileo-colon	2
<b>Localizzazione di malattia nei pazienti UC</b>	
Proctite	0
Colite sinistra	5
Pancolite	13
<b>Trattamenti concomitanti</b>	
Mesalazina	21
Salazopirina	2
Steroidi	15
Azatioprina	2
<b>Trattamenti precedenti</b>	
Infliximab	9
Adalimumab, Golimumab	1

**Tabella 2:** Caratteristiche dei pazienti affetti da IBD, al T0

Questi pazienti sono stati indagati al momento dell'arruolamento attraverso vari score per definirne l'attività di malattia, come il Mayo partial score, Il Mayo full score e il Mayo endoscopic score nel caso della colite ulcerosa, mentre è stato utilizzato l'HBI (Harvey-Bradshaw index) e il SES-CD (Simple endoscopic score for Crohn's disease) nel caso della malattia di Crohn, i cui risultati sono riportati nelle tabelle sottostanti.

Dei 23 pazienti inizialmente reclutati 18 si sono sottoposti alla visita e all'endoscopia prevista al tempo 1, trascorse le 24 settimane di trattamento con Vedolizumab; di questi 18 pazienti 8 si sono sottoposti alla visita al tempo 2, dopo 52 settimane di trattamento con Vedolizumab, tuttavia 3 pazienti su 8 non hanno eseguito la colonscopia al T2. In questo momento sono stati nuovamente valutati gli score clinici ed endoscopici precedentemente illustrati, in modo da evidenziare eventuali variazioni delle condizioni cliniche.

	T0	T1	T2
<b>Numero di pazienti con UC</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>9</b>
<b>Attività di malattia nei pazienti UC (Mayo Partial score)</b>			
<2 remissione	1	7	8
2-4 attività lieve	9	7	1
5-7 attività moderata	7	0	0
>7 attività grave	1	0	0
<b>Attività di malattia nei pazienti UC (Mayo Full score)</b>			
0-2 remissione	0	5	5
3-5 attività lieve	1	5	1
6-10 attività moderata	9	1	0
>10 attività grave	0	0	0
<b>Attività di malattia nei pazienti UC (Mayo Endoscopic score)</b>			
0-1 Remissione	0	5	5
2 attività moderata	5	3	1
3 attività grave	6	3	0
<b>Numero di pazienti con CD</b>	<b>4</b>		
<b>Attività di malattia nei pazienti CD (HBI)</b>			
<5 remissione	2	1	2
5-7 attività lieve	2	3	1
8-16 attività moderata	0	0	0
>16 attività grave	0	0	0
<b>Attività di malattia nei pazienti CD (SES CD)</b>			
0-2 remissione	3	3	3
3-6 attività endoscopica lieve	1	1	0
7-15 attività endoscopica moderata	0	0	0
>15 attività endoscopica grave	0	0	0

**Tabella 3:** attività di malattia nei pazienti affetti da IBD tra il t0, il t1 e il t2

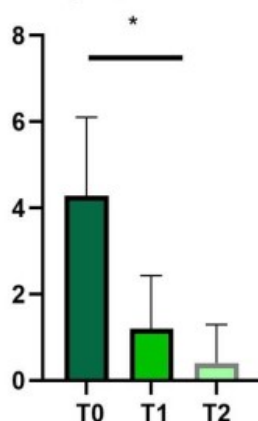
## - Variazione degli score clinici ed endoscopici tra T0, T1 e T2

I pazienti di cui sono stati confrontati i valori dei differenti score clinici ed endoscopici, come il Mayo partial score, sono 18 al T0, 14 al T1 e 8 al T2, tuttavia al tempo T1 e T2, 3 pazienti non hanno eseguito la colonscopia di controllo, perciò nella valutazione del Mayo full score e del Mayo endoscopic score osserviamo 18 pazienti al T0, 11 al T1 e 5 al T2. (figure 1,2,3).

I valori sono stati confrontati con il Wilcoxon test per dati appaiati, che ha mostrato una differenza statisticamente significativa sia tra il T0 e il T1 ( $p = 0,0002$ ) sia tra T0 e T2 ( $p=0,007$ ), per la variazione del Mayo partial score, così come per il Mayo full score sia tra T0 e T1 ( $p=0,002$ ) sia tra T0 e T2 ( $p=0,004$ ). Nel caso del Mayo endoscopic score la differenza è risultata statisticamente significativa sia tra T0 e T1 ( $p=0,027$ ) che tra tra T0 e T2 ( $p=0,03$ ).

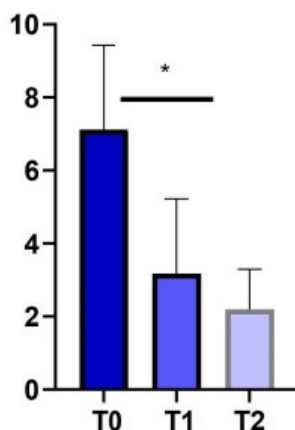
**Figura 1**

**Variazione del Mayo partial score tra t0, t1 e t2**



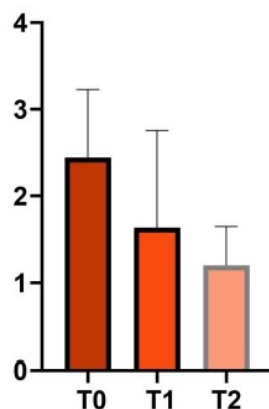
**Figura 2**

**Variazione del Mayo full score tra T0, T1 e T2**



**Figura 3**

**Variazione del Mayo endoscopic score tra T0, T1 e T2**



**- Confronto dell'integrità mucosale colica tra pazienti IBD e controlli**

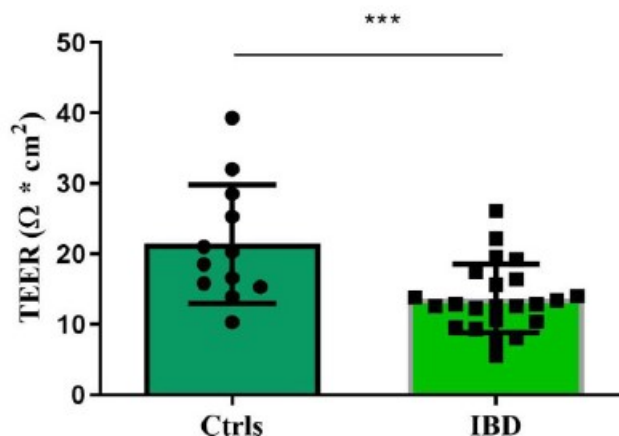
I valori misurati relativi alla permeabilità intestinale mostrano una differenza statisticamente significativa nel confronto tra il gruppo dei controlli sani e il gruppo dei pazienti affetti da IBD (**figure 4 e 55**), con  $p = 0,0063$  a nel caso della resistenza elettrica trans-epiteliale, e  $p = 0,04$  nel caso del passaggio di FD-4 (**Tabella 4**). Sono stati confrontati i valori medi dei due gruppi attraverso il test di Mann-Whitney per dati non appaiati.

Per la TEER sono stati presi in considerazione 12 pazienti controllo e 23 pazienti IBD, mentre per la valutazione del passaggio di FD-4 rientrano 13 pazienti controllo e 21 pazienti IBD.

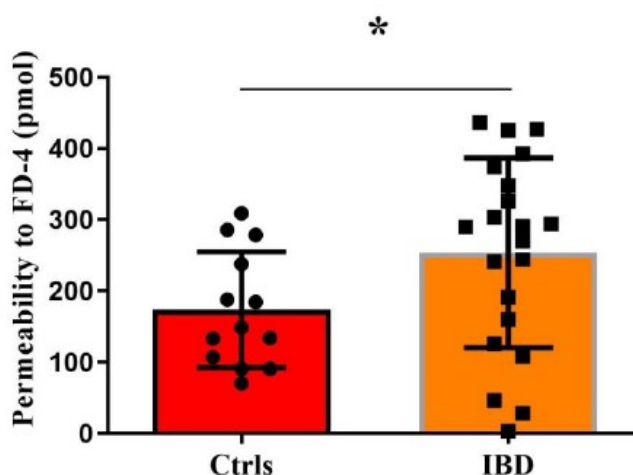
**Tabella 4** Permeabilità intestinale: confronto tra pazienti IBD (t0) e controlli

	<b>Valore medio della TEER</b> (espressi in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	<b>Passaggio di FD-4</b> (espresso in pmol)
<b>Controlli (Ctrl)</b>	21,13	148,6
<b>Pazienti IBD al t0</b>	12,80	289,9

**Figura 4**



**Figura 5**



#### - Confronto dell'integrità mucosale colica tra i pazienti IBD al T0, T1 e T2

Nel confronto tra i pazienti IBD al T0, i pazienti IBD al T1 e i pazienti IBD al T2 (Tabella 6, Figure 6 e 7) si evidenzia una differenza statisticamente significativa dei valori della TEER confrontati attraverso il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati, che è risultato molto significativo sia tra T0 e T1 ( $p=0,0002$ ), sia tra T0 e T2 ( $p=0,015$ ).

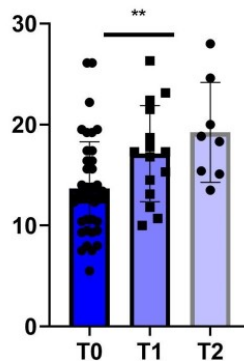
Nel caso del passaggio di FD-4 il numero di dati disponibili per l'analisi statistica al T2 è stato inferiore a quello impiegato per la TEER a causa di artefatti di laboratorio (4 misurazioni valide invece delle 7 effettuate per la TEER) e si è preferito pertanto utilizzare un test non parametrico, il Wilcoxon test per dati appaiati, e il risultato è stato non statisticamente significativo né tra T0 e T1 ( $p=0.8$ ) né tra T0 e T2 ( $p=0.6$ ).

**Tabella 6**

	Valore medio della TEER (espressi in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	Passaggio di FD-4 (espresso in pmol)
Controlli	21,13	148,6
Pazienti IBD al t0	12,80	289,9
Pazienti IBD al t1	17,1	259,4
Pazienti IBD al t2	18,1	217,0
Malattia di Crohn al t0	14,5	301,6
Malattia di Crohn al t1	18,9	289,7
Malattia di Crohn al t2	17,5	131,8
Rettocolite ulcerosa al t0	15,7	218,6
Rettocolite ulcerosa al t1	16,4	258,32
Rettocolite ulcerosa al t2	18,0	159,37

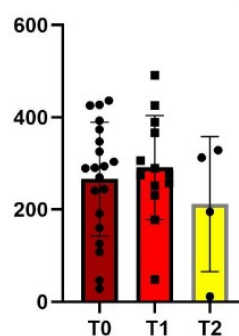
**Figura 6**

**Confronto della TEER tra T0, T1 e T2**



**Figura 7**

**Confronto FD4 tra T0, T1 e T2**





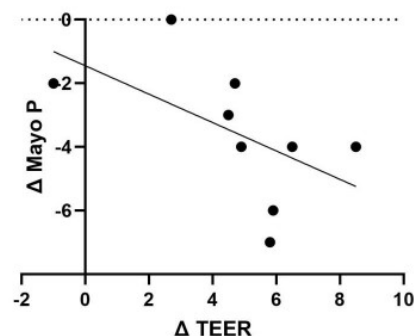
## - Analisi della correlazione tra il miglioramento dei valori degli score clinici ed endoscopici e il miglioramento degli indici di permeabilità intestinale tra i pazienti IBD

In questo caso sono state confrontate le variazioni di permeabilità con le variazioni dei differenti score, confrontando quindi due differenze ottenute sottraendo il risultato del T0 al risultato del T1 (**Figure 8,9,10**). La regressione lineare tra questi due delta suggerisce che i miglioramenti clinici e laboratoristici siano correlati, in particolare il dato relativo al Partial Mayo score ha un valore di r quadro del 31%, mentre il Mayo full score ha mostrato un valore di r quadro del 13% ed infine il Mayo endoscopic score ha mostrato un valore di r molto inferiore e vicino allo 0 (p non significativa).

È interessante osservare come la clinica dei pazienti migliori velocemente grazie al trattamento con il Vedolizumab, mentre lo stato infiammatorio a carico del TGI permane più a lungo come dimostra la valutazione endoscopica eseguita con il Mayo score e la sua relativa regressione lineare.

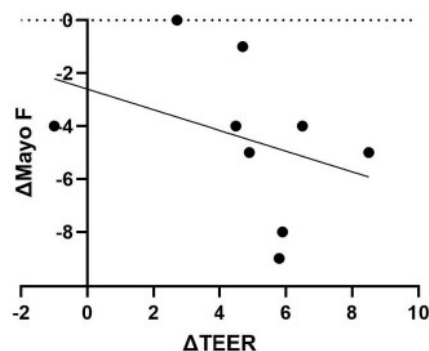
**Figura 8**

correlazione tra la differenza della TEER e la differenza del Mayo partial



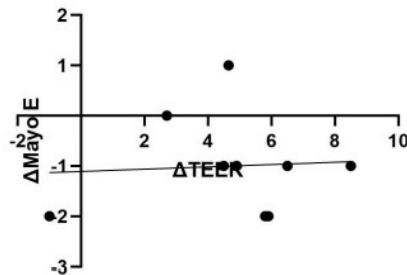
**Figura 9**

correlazione tra la differenza della TEER e la differenza del Mayo full score



**Figura 10**

correlazione tra la differenza della TEER e la differenza del Mayo endoscopico



## 6.4 DISCUSSIONE

Le malattie infiammatorie croniche intestinali sono patologie estremamente complesse da analizzare, e la loro patogenesi non è ancora del tutto nota. L'alterazione della permeabilità intestinale nelle IBD è ampiamente documentata in letteratura, e la sua correlazione con le caratteristiche cliniche della patologia la rendono un aspetto di cruciale importanza nella comprensione di aspetti riguardanti la patogenesi, l'attività di malattia e la risposta alla terapia<sup>136</sup>.

Lo scopo del nostro studio, condotto su una popolazione di 23 pazienti affetti da IBD (di cui 18 hanno svolto una rivalutazione dopo 24 settimane e 8 dopo 52 settimane) e 16 controlli, è stato quello di studiare la correlazione tra l'alterata clinica del paziente e l'integrità mucosale colica, valutata con la metodica delle Ussing chamber, che è attualmente considerata il *gold standard* nello studio della permeabilità intestinale sia su mucosa sana che patologica<sup>6</sup>.

I nostri risultati mostrano l'alterazione della permeabilità mucosale colica nei pazienti affetti da IBD rispetto ai controlli, espressa in termini di riduzione della resistenza elettrica transepiteliale (TEER) e aumento del passaggio paracellulare di FD-4. Inoltre, i risultati confermano, come era stato ipotizzato un sensibile aumento della permeabilità mucosale colica in correlazione al miglioramento delle manifestazioni cliniche dopo 24 settimane (T1) e dopo 52 settimane (T2) di trattamento con Vedolizumab. Tale effetto del farmaco sulla mucosa dei pazienti con IBD non era mai stato indagato<sup>87,88</sup>.

Nell'analizzare i nostri risultati risulta utile distinguere le implicazioni dell'alterata permeabilità intestinale rispetto ai differenti aspetti della patologia, cioè la patogenesi, le manifestazioni cliniche e la risposta alla terapia. Riguardo al ruolo delle alterazioni della permeabilità intestinale nella patogenesi delle IBD, gli studi presenti in letteratura sostengono due teorie, ovvero che l'aumento di permeabilità intestinale sia secondario all'infiammazione conseguente alla patologia, o che questo sia un difetto primario che compare addirittura prima

dell'insorgere della patologia. Tra le evidenze a sostegno della prima teoria si sottolinea il possibile ruolo delle citochine infiammatorie come il TNF- $\alpha$  nelle genesi dei difetti di barriera, poiché causano disfunzioni epiteliali nei modelli in vitro e perché il trattamento con i loro antagonisti (anti-TNF) è in grado di normalizzare la permeabilità nei pazienti affetti da CD<sup>140,141</sup>. Riguardo alla seconda teoria, la quale sostiene che l'aumento della permeabilità sia un evento antecedente all'insorgenza della patologia, ci sono vari studi rilevanti, come quello di Suenart *et al.*<sup>142</sup>, il quale ha mostrato che l'iper-responsività all'indometacina, in termini di aumento della permeabilità intestinale, non viene soppressa dal trattamento con anti-TNF, in un gruppo di pazienti affetti da CD. Questa osservazione sostiene quindi l'indipendenza dall'infiammazione dei difetti della barriera epiteliale<sup>143</sup>. Ci sono altre osservazioni che supportano questa teoria, come il fatto che nei pazienti affetti da CD asintomatici l'aumento della permeabilità preceda la riacutizzazione di malattia di anche un anno<sup>144</sup>, o la descrizione di un aumento di permeabilità nei familiari sani dei pazienti affetti da IBD<sup>145</sup>. Un caso interessante riguarda il case report di una ragazza con un'importante familiarità per IBD, che ha mostrato un aumento della permeabilità intestinale già 8 anni prima di ricevere la diagnosi di CD<sup>5</sup>. Queste due teorie possono essere affiancate ipotizzando che la disfunzione primaria della barriera causi un passaggio iniziale di contenuti luminali, che a sua volta scateni una risposta immunitaria con il risultato di mantenere la l'alterazione di barriera e l'esacerbazione della patologia<sup>146</sup>.

Nel nostro studio emerge una significativa differenza tra i valori di permeabilità dei pazienti affetti da IBD al momento dell'arruolamento e quelli dei controlli, e questo dato trova numerose conferme in letteratura. Ad esempio, nel lavoro di Keita *et al.*<sup>147</sup>, sono state analizzate attraverso le Ussing Chambers le biopsie ileali di 15 pazienti affetti da CD e dei loro gemelli sani (di cui 9 omozigoti e 6 dizigoti). Questo studio ha confermato un'aumentata permeabilità dei pazienti rispetto ai controlli, tuttavia l'alterazione della permeabilità intestinale è stata riscontrata anche nei gemelli dei pazienti che non avevano sviluppato alcuna patologia infiammatoria. Questi risultati supportano l'ipotesi che l'alterazione della permeabilità sia un deficit primario della malattia di Crohn, e che possa essere influenzato da importanti fattori genetici, data la maggiore permeabilità paracellulare osservata nei gemelli monozigoti sani rispetto ai gemelli dizigoti. Anche nei pazienti affetti da colite ulcerosa è presente un aumento della permeabilità misurato attraverso le Ussing chambers, ad esempio nello studio di Vivinus-Nébot *et al.*<sup>136</sup> vengono analizzate biopsie ciecali di pazienti affetti da CD e CU, ed i risultati confermano questo aumento che sembra essere correlato all'attività di malattia e ai sintomi manifestati dai pazienti.

Nel nostro studio, inoltre, i valori relativi alla permeabilità mucosale si sono modificati nei pazienti dopo 24 settimane di trattamento, in modo proporzionale al miglioramento delle condizioni

cliniche, senza però raggiungere i valori della popolazione dei controlli sani. Questa osservazione suggerisce quindi che il trattamento dell'inflammation sia utile a ripristinare una permeabilità più vicina a valori normali, ma allo stesso tempo che vi sia un'alterazione funzionale della barriera intestinale che nonostante le terapie può migliorare ma non regredire completamente. Questo dato è coerente con il fatto che siano conosciuti vari geni deputati al mantenimento dell'integrità mucosale che sono alterati in questi pazienti, costituendo quindi una parte importante della predisposizione genetica alla patologia, non migliorabile farmacologicamente<sup>146,148,149</sup>. Dopo 52 settimane di trattamento con Vedolizumab la permeabilità mucosale è ulteriormente migliorata avvicinandosi notevolmente ai valori corrispondenti alla popolazione sana, pur non uguagliandoli.

Riguardo alla correlazione tra l'alterata permeabilità intestinale e l'attività di malattia esistono varie conferme presenti in letteratura<sup>136</sup>. In alcuni studi come quello di Suenart *et al.*<sup>142</sup> il miglioramento dei valori di permeabilità, dopo il trattamento, si accompagna ad un miglioramento dei dati clinici. Nel nostro studio abbiamo osservato, nei pazienti con CU, una forte correlazione tra il miglioramento del Mayo Partial score<sup>82</sup> e la permeabilità intestinale tra il T0 e il T1. Risulta invece non significativa la correlazione tra il Mayo endoscopic score e la permeabilità intestinale tra il T0 e il T1: questo è spiegato dal fatto che la remissione clinica avviene più precocemente della remissione endoscopica, che comunque tutti i pazienti CU del nostro studio hanno raggiunto dopo 52 settimane di trattamento (T2). Uno studio del 2018 su pazienti con CU ha mostrato come la remissione endoscopica nella terapia con Vedolizumab venga raggiunta dopo 52 settimane di trattamento nel 95% dei pazienti, mentre la maggior parte dei pazienti (70%) raggiungono la remissione clinica già dopo 6 settimane di trattamento<sup>88,150</sup>.

Il nostro studio indaga la risposta della barriera intestinale ad un trattamento farmacologico, e in letteratura esistono alcuni studi di questo tipo, anche se trattano di farmaci diversi dal Vedolizumab e hanno utilizzato in genere metodiche diverse dalle Ussing chamber. Infatti, il metodo standard per misurare, in modo indiretto, la permeabilità intestinale è la ricerca urinaria di zuccheri non metabolizzati o di substrati radioattivi (<sup>51</sup>Cr-EDTA) somministrati per via orale. Tuttavia, questa metodica manca di precisione nel determinare la permeabilità di una specifica porzione dell'intestino.

Esistono quindi vari farmaci in grado, tra i vari effetti, di agire sulla permeabilità intestinale, e tra questi ci sono corticosteroidi, aminosalicilati, anti tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), probiotici e protettori mucosali. Mentre i corticosteroidi, i salicilati e gli anti-TNF- $\alpha$  agiscono sulla modulazione della permeabilità riducendo l'inflammation intestinale, i probiotici sembrano modulare la produzione di mucina e la competenza delle tight junctions. Il prednisone è in grado di ridurre la permeabilità intestinale nel 50% dei pazienti 225, e anche il prednisolone ha questa

proprietà in entrambe le IBD<sup>151</sup>. Questo effetto è conseguente all'attività anti-infiammatoria dei corticosteroidi, con la capacità di inibire l'espressione di citochine pro-infiammatorie come TNF $\alpha$  e NF- $\kappa$ B<sup>152</sup>.

Alcuni studi hanno indagato l'effetto sulla permeabilità intestinale dei farmaci anti-TNF- $\alpha$ , come nel caso di di Suenart *et al.*<sup>142</sup> che ha dimostrato che l'escrezione urinaria di 51Cr-EDTA) in un gruppo di 23 pazienti affetti da malattia di Crohn tornava ad un livello normale dopo una singola infusione di 5 mg/kg di Infliximab. Un ulteriore studio che ha indagato questo aspetto è quello di Noth *et al.*<sup>141</sup>, che ha mostrato una marcata riduzione della permeabilità misurata con un test differente (basato sull'assorbimento intestinale di lattulosio e mannitolo), dopo un trattamento con Infliximab in 17 pazienti affetti da malattia di Crohn. Un unico lavoro ha analizzato questo aspetto utilizzando le Ussing chambers in un gruppo di 7 pazienti affetti da CD, riscontrando un miglioramento della permeabilità paracellulare dopo il trattamento con Infliximab<sup>153</sup>.

Vi sono quindi varie conferme riguardo all'importanza della modulazione farmacologica della barriera intestinale, e il nostro studio si inserisce in questo capitolo apportando delle significative innovazioni, infatti è il primo studio che indaga l'effetto del Vedolizumab, che agisce con meccanismi differenti dai farmaci precedentemente descritti. Inoltre, utilizza la metodica che è il *gold standard* in questo tipo di studi<sup>6</sup>, a differenza di molti altri lavori hanno utilizzato degli approcci *in vivo*.

Nel nostro studio risultati relativi all'effetto del Vedolizumab sulla condizione clinica ed endoscopica dei pazienti sono differenti a seconda del sottogruppo di pazienti preso in esame. Si è osservato un miglioramento notevole degli score clinici ed endoscopici relativi ai pazienti affetti da colite ulcerosa, mentre nel caso della malattia di Crohn si sono registrate risposte dal punto di vista clinico solo in due pazienti, e tre dal punto di vista endoscopico, tuttavia in questo caso il ridottissimo numero di pazienti ha probabilmente impedito una valutazione accurata e la possibilità di ottenere dei dati con una potenza statistica significativa. In letteratura è riportato il funzionamento del Vedolizumab in entrambe le patologie, e con un aumento del campione si andrà probabilmente in questa direzione<sup>87-89</sup>.

Tra gli sviluppi futuri di questo studio potrebbe essere importante anche la valutazione immunoistochimica e genomica della mucosa intestinale ricavata da prelievi biotici di entrambe le popolazioni, in modo da esaminare quali proteine strutturali risultano alterate in questi pazienti, eventualmente correlando le alterazioni alla sintomatologia clinica. Un altro aspetto che potrebbe essere oggetto di studio in futuro in questa coorte di pazienti è la presenza di sintomi IBS-like, che come dimostra il lavoro di Vivinus-Nébot<sup>154</sup> sono di grande rilevanza nel determinare i valori di permeabilità intestinale anche nei pazienti affetti da IBD. Infine una correlazione tra le alterazioni

del microbiota, la variazione della permeabilità intestinale e la clinica di questi pazienti è mandatoria e sarà oggetto di analisi future in questa coorte di pazienti.

In conclusione, i risultati del nostro studio hanno dimostrato un'alterazione della permeabilità intestinale colica nei pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali e un significativo miglioramento dei parametri relativi alla permeabilità dopo 52 settimane di trattamento con Vedolizumab. Quando le due sottopopolazioni di IBD sono state analizzate separatamente, solo i pazienti affetti da CU hanno mostrato un miglioramento significativo degli score clinici al T2, parallelamente ad un miglioramento significativo della permeabilità. Nella malattia di Crohn non è stato possibile riscontrare risultati significativi, probabilmente per il ridotto numero di pazienti arruolati in questa fase preliminare.

I dati, in parte in linea con la letteratura attuale ma anche innovativi, rappresentano un'ulteriore evidenza a favore del fatto che un difetto di barriera epiteliale potrebbe contribuire allo sviluppo delle IBD e dimostrano l'effetto benefico del Vedolizumab sulla permeabilità-competenza della barriera epiteliale dopo 52 settimane di trattamento, in particolare nei pazienti affetti da Colite Ulcerosa.

## CAPITOLO 7. ANALISI DEL MICROBIOTA IN PAZIENTI CON SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE: CORRELAZIONE TRA ALIMENTAZIONE E SINTOMATOLOGIA CLINICA

### 7.1 Introduzione e scopo dello studio

Il tratto gastrointestinale (GI) umano ospita la più abbondante e diversificata comunità microbica esistente in natura, il microbiota, composta da batteri anaerobi obbligati<sup>41</sup>, virus (specialmente batteriofagi), *Archea* ed *Eukaryota*, quali funghi, lieviti, amebe, protozoi e altri<sup>16,27</sup>. La maggiore densità microbica si ha nella porzione distale del colon, con un carico di  $10^{11}$ - $10^{12}$  cellule batteriche/grammo di contenuto enterico, codificanti per oltre 3 milioni di geni e con produzione di migliaia di metaboliti<sup>25</sup>, superando di gran lunga il numero di geni, cellule somatiche e germinali umane. Sono stati descritti sei phyla batterici predominanti l'intestino crasso: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia. I primi due phyla rappresentano oltre il 90% del microbiota intestinale<sup>27</sup>. È un ecosistema estremamente dinamico che si sviluppa subito dopo la nascita, dipendente dal contatto del nascituro con i microrganismi autoctoni e alloctoni, derivanti cioè da componenti esterne, e soggetto a variabilità intra- e interindividuale nel tempo<sup>27</sup>. Tale ecosistema microbico intestinale è coinvolto in molteplici funzioni metaboliche, trofiche, di barriera intestinale e immunitarie, garantendo il mantenimento di un equilibrio omeostatico simbiotico tra la flora batterica e l'ospite. Una disbiosi intestinale, ovvero uno squilibrio nell'abbondanza di specie o generi batterici, con conseguente perdita di omeostasi, è stata descritta in numerosi stati patologici intestinali ed extra-intestinali. Tra questi vi è la Sindrome dell'Intestino Irritabile (IBS), già ampiamente discussa nei capitoli precedenti, i cui possibili fattori eziologici sono legati a disturbi della sfera psicologica, ipersensibilità viscerale, alterazioni motorie intestinali, alterazioni dell'integrità di barriera epiteliale, del sistema immunitario e neuro-endocrino, polimorfismi genetici e una disbiosi intestinale<sup>2,39,96</sup>. In particolare, l'alterazione della diversità composizionale del microbiota intestinale, determinata ad esempio da abitudini alimentari scorrette, eccessive restrizioni dietetiche e/o altri fattori dietetici e ambientali, sembra svolgere un ruolo sostanziale nella fisiopatologia dell'IBS, con possibile esacerbazione dei sintomi clinici denunciati dai pazienti con IBS.

Considerando ciò, in questo studio abbiamo mirato a identificare le famiglie/specie batteriche, costituenti il microbiota estratta da campioni biotici mucosali e campioni di feci in soggetti adulti IBS e controlli sani, attraverso l'analisi di sequenza del gene marcatore ribosomiale 16S (16S rRNA), al fine di identificare differenze specifiche tra i due gruppi nella ricchezza e distribuzione del microbiota associato alla mucosa e fecale. Un ulteriore scopo è stato quello di

valutare potenziali marcatori batterici di ampliconi genici del 16S rRNA per IBS, confrontando le OTU relative alla composizione tassonomica tra i due gruppi, permettendo di prevedere quali batteri si differenziano in modo caratteristico tra i CTRL e IBS e identificare potenziali batteri associati ai processi micro-infiammatori della mucosa intestinale dell'IBS.

Dato che la composizione del microbiota è modulata dalla dieta, in modo rapido e riproducibile<sup>155</sup>, l'obiettivo secondario del nostro studio è stato quello di valutare il modello alimentare dei pazienti IBS, suddivisi per sottotipo di malattia (IBS-S, IBS-D, IBS-M), e volontari sani (CTRL), al fine di ottenere informazioni sulle abitudini alimentari, valutare l'*intake* energetico-calorico giornaliero, la frequenza di assunzione degli alimenti e la compliance al modello di dieta mediterranea. Per questo motivo, abbiamo correlato i dati alimentari ottenuti alla sintomatologia clinica lamentata dai pazienti e ai risultati dell'analisi metagenomica, al fine di individuare un'eventuale corrispondenza tra alimentazione e abbondanza/riduzione di specie batteriche potenzialmente implicate nella comparsa, cronica e ricorrente, di dolore addominale e variazioni dell'alvo in soggetti con IBS.

## 7.2 Materiali e metodi

### - Popolazione dello studio

**Pazienti IBS:** Nello studio osservazionale e sperimentale sono stati arruolati n. 44 pazienti affetti da Sindrome dell'Intestino Irritabile (IBS), con un'età mediana di 55 (29 – 69), afferenti all'ambulatorio del reparto di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva del Policlinico Universitario "Campus Bio-Medico" di Roma, tra il 2015 e il 2017. I pazienti con IBS inclusi nello studio sono stati arruolati considerando i seguenti criteri di inclusione e di esclusione:

Criteri di inclusione: La diagnosi di IBS è stata posta mediante l'iter diagnostico-terapeutico elaborato secondo i Criteri di Roma IV<sup>44</sup>.

Criteri di esclusione: Uso di farmaci antibiotici o integratori batterici probiotici nei precedenti 3 mesi; uso di farmaci FANS nei precedenti 3 mesi; recenti diagnosi di infezioni batteriche o parassitarie del tratto gastrointestinale in un periodo inferiore a 3 mesi; grave malattia psichiatrica come problema clinico dominante;

Pazienti CTRL: Come controlli sono stati arruolati n. 47 pazienti sani, con età mediana 57 (27 – 75), afferenti al servizio di Endoscopia Digestiva del Policlinico Universitario "Campus Bio-Medico" di Roma per effettuare lo screening del cancro del colon-retto o di follow-up in seguito all'asportazione di adenomi. A ciascun paziente arruolato è stata richiesta la sottoscrizione di un Consenso Informato scritto per l'adesione allo studio. Lo studio è stato redatto in conformità alla Norme di Buona Pratica Clinica dell'Unione Europea e all'ultima revisione della Dichiarazione di



Helsinki, dopo l'approvazione da parte del Comitato Etico Medico del Policlinico "Campus Bio-Medico" di Roma.

### **- Campioni fecali e mucosali**

I campioni biotici mucosali sono stati ottenuti da n. 44 pazienti con IBS e n. 45 pazienti sani durante l'esame endoscopico del tratto digestivo inferiore previa preparazione con PEG (4 litri) e dieta priva di scorie nei 3 giorni precedenti l'esame. I campioni fecali sono stati raccolti da n. 36 pazienti con IBS e n. 41 pazienti sani. Ciascun campione di feci è stato raccolto dai partecipanti arruolati il giorno prima alla preparazione con PEG o due settimane dopo l'esame endoscopico del tratto digestivo inferiore. Tutte le biopsie e i campioni fecali raccolti sono stati immediatamente conservati a -80 ° C in apposite vials fino al trattamento, per impedire che i batteri anaerobici vengano esposti all'ossigeno e per evitare la proliferazione batterica prima dell'estrazione del DNA. Tutte le biopsie coliche e campioni fecali sono stati inviati all'Unità del Microbioma Umano dell'ospedale pediatrico Bambino Gesù di Roma.

### **- Estrazione del DNA, amplificazione per il pirosequenziamento, analisi statistica del microbiota fecale e mucosale**

Tale metodica è stata ampiamente illustrata nel Capitolo 5 di questa tesi.

### **- Diario Alimentare**

Sono state valutate le abitudini alimentari di n.49 soggetti adulti, suddivisi in n. 28 pazienti con IBS (57%) [n. 9 pazienti con IBS-S; n. 11 pazienti con IBS-D; n. 8 pazienti con IBS-M] e n. 21 CTRL sani (43%), attraverso la compilazione di un diario alimentare settimanale, uno strumento semplice e pratico studiato appositamente per indagare l'*intake* calorico, glucidico, proteico, lipidico e di fibra alimentare giornaliero, in accordo ai Livelli di Assunzione e di Riferimento di Nutrienti ed Energia per la popolazione italiana (LARN: IV Revisione, 2014) della Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU). La durata del diario è stata di sette giorni, durante i quali il paziente era tenuto a riportare in modo dettagliato:

- Orario e luogo dei pasti (in casa – fuori casa)
- Tipologia e quantità di alimento assunto
- Presenza/assenza di eventuali disturbi gastrointestinali insorti in seguito all'assunzione dell'alimento (nausea, vomito, eruttazioni, piroso, risalita del contenuto gastrico, senso di ripienezza post-prandiale, impossibilità di finire il pasto, dolore/fastidio addominale, distensione addominale, flatulenza).

- Presenza/assenza di evacuazione, tempo che intercorre tra l'assunzione del pasto e l'evacuazione, forma delle feci classificata mediante la rappresentazione della Bristol Stool Scale.

- Presenza/assenza di dolore addominale in seguito all'evacuazione.

Inoltre, il diario prevedeva da parte dei soggetti reclutati l'inserimento dei parametri antropometrici: l'altezza (m) e il peso corporeo (Kg), che hanno permesso di calcolare l'Indice di Massa Corporea, in inglese definito Body Mass Index (BMI), dei pazienti IBS e CTRL. Il BMI è dato dal rapporto tra il peso (Kg) e l'altezza al quadrato (m<sup>2</sup>), secondo la formula riportata:

$$BMI = \frac{\text{peso corporeo (Kg)}}{\text{Altezza (m)}^2}$$

Secondo la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), i pazienti sono stati classificati in sottopeso (BMI <18,50 kg/m<sup>2</sup>), sovrappeso (BMI tra 25 e 29,9 kg/m<sup>2</sup>), obeso (BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>) e normopeso (18,50-24,99 kg/m<sup>2</sup>).

#### - Mediterranean Diet Serving Score (MDSS)

Per definire il grado di aderenza al modello alimentare della Dieta Mediterranea (MD) e valutare la frequenza di assunzione settimanale degli alimenti e di gruppi alimentari tipici della dieta del nostro territorio, è stato utilizzato il "Mediterranean Diet Serving Score" (MDSS), validato da Monteagudo et al.<sup>156</sup>. Il MDSS si basa sull'ultimo aggiornamento della piramide alimentare della MD e prende in considerazione gli alimenti che dovrebbero essere consumati in ogni pasto (frutta, verdura, olio extravergine di oliva, cereali), seguiti da quelli che dovrebbero essere consumati quotidianamente (latticini e frutta secca), seguiti da quelli che dovrebbero essere consumati con frequenza settimanale (patate, legumi, uova, pesce, carni bianche, carni rosse, dolci). A ciascun individuo, la cui assunzione rientra nel numero di porzioni raccomandate a pasto, giorno, settimana, è stato assegnato un punteggio di 3, 2 o 1 punti, rispettivamente. L'indice MDSS ha uno score da 0 a 24 per un soggetto adulto. Un punteggio di ≤16 indica una mancata aderenza alla MD, mentre un punteggio di ≥16 indica l'aderenza alla MD.

#### - Valutazione dei sintomi gastrointestinali

A tutti i pazienti è stato somministrato un questionario standardizzato per la valutazione dei seguenti sintomi gastrointestinali: stipsi e diarrea (utilizzando la rappresentazione grafica della Bristol Stool Scale), dolore/discomfort addominale, e flatulenza (emissione di gas intestinali prodotti dalla fermentazione del cibo non digerito nel colon). Il questionario è stato fornito da KULeuven, centro di riferimento per le linee guida di IBS.

## - Analisi Statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism 8.0. La normalità dei dati è stata valutata mediante il test Shapiro-Wilk. Poiché la distribuzione dei dati demografici e alimentari non è risultata essere normale, sono stati applicati i test non parametrici Mann-Whitney e Kruskal-Wallis per l'analisi del t-student e della varianza (one-way ANOVA), per confrontare i dati provenienti dai diversi gruppi di pazienti. I valori di p delle analisi statistiche sono stati considerati significativi se  $p < 0.05$ .

### 7.3 PARTE A: Risultati dello studio analisi metagenomica IBS vs CTRL

#### Popolazione di studio

Il nostro studio ha coinvolto un totale di n.91 soggetti adulti, suddivisi in n.47 controlli sani (CTRL) e n.44 pazienti affetti da IBS, arruolati dall'Unità di Gastroenterologia del Policlinico Campus Bio-Medico di Roma, tra il 2015 e 2017. L'età media della popolazione in studio è di 55 anni (27 – 72). I maschi rappresentano il 45% della popolazione in studio, le donne il 55% (n.50).

Tramite l'utilizzo della Bristol Stool Scale, fornita dai Criteri di Roma IV<sup>32</sup>, è stato possibile suddividere la popolazione totale dei pazienti IBS (N=44) in tre sottotipi di malattia sulla base delle caratteristiche dell'alvo e forma delle feci:

- IBS, variante stipsi: n=16 (36%) [M: n=2 (12.5%); F: n=14 (87.5%)];
- IBS, variante diarrea: n=15 (34%) [M: n=6 (40%); F: n=9 (60%)];
- IBS, variante mista: n=13 (30%) [M: n=6 (46.2%); F: n=7 (53.8%)].

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con IBS e dei CTRL sono mostrate nella **Tabella 1A**.

**Tabella 1A:** Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti IBS e CTRL

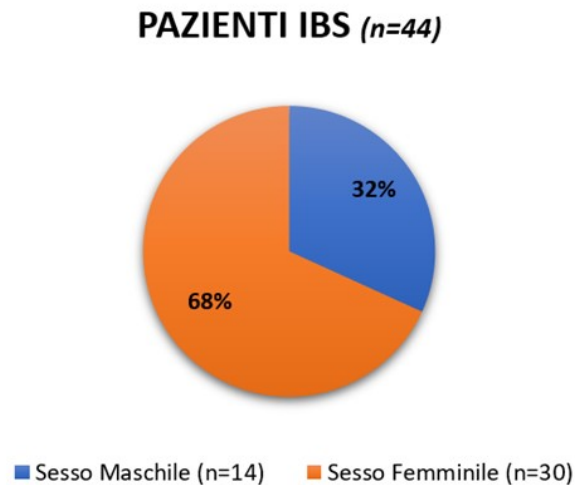
	CTRL (N=47) 52%	IBS (N=44) 48%
<b>Età (anni)</b>	57 (27 – 75)	55 (29 – 69)
<b>Maschi, N (%)</b>	27 (57)	14 (32)
<b>Femmine, N (%)</b>	20 (43)	30 (68)
<b>Sottotipi di IBS</b>		
<i>Stipsi, N (%)</i>	NA	16 (36)
<i>Diarrea, N (%)</i>	NA	15 (34)
<i>Mista, N (%)</i>	NA	13(30)

<sup>o</sup> Mediana (range)

<sup>a</sup> Media ± deviazione standard

NA, non applicabile.

La popolazione IBS ha mostrato una predominanza di pazienti di sesso femminile (68%), rispetto alla maschile (32%), a causa della maggiore prevalenza della malattia nel sesso femminile. (Grafico 1A).



#### - Campioni fecali e mucosali

Un totale di 77 campioni fecali è stato incluso in questo studio, in particolare 36 da pazienti IBS e 41 da CTRL (22 soggetti non hanno raccolto campioni fecali). Un totale di 89 biopsie è stato incluso in questi studio, in particolare sono state raccolte 45 biopsie da CTRL e 44 da pazienti con IBS.

#### - Composizione e distribuzione del microbiota fecale

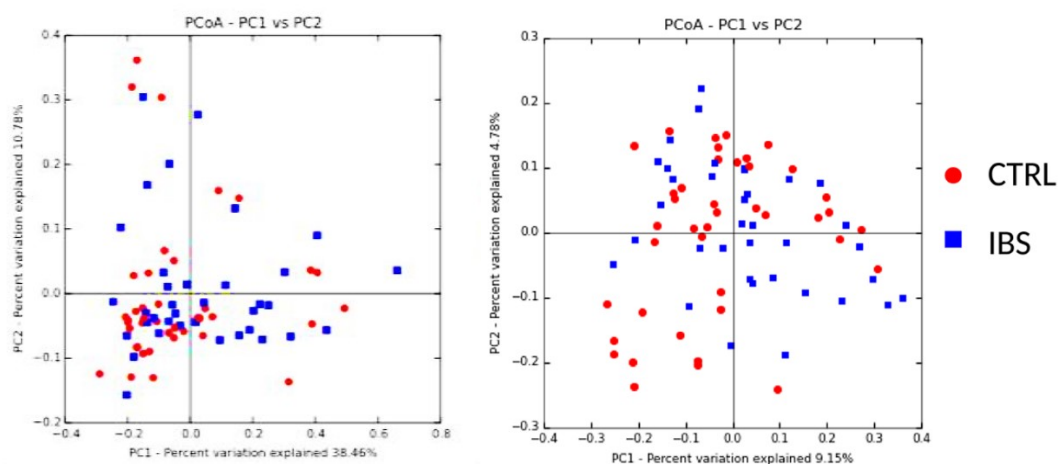
Un totale di 220.951,00 letture di sequenziamento è stato ottenuto dai 77 campioni fecali, con un valore medio di 2.869 sequenze per campione. Le differenze di microbiota in IBS e CTRL sono state misurate con l' $\alpha$  e  $\beta$  diversità. L'analisi dell' $\alpha$  diversità, relativa alla ricchezza/biodiversità del microbiota, effettuata utilizzando gli indici di Shannon e Chao I (test per confronti appaiati tra medie per verificare se la differenza tra due medie superi o meno il valore LSD=differenza minima significativa), ha mostrato una riduzione della diversità microbica dai CTRL all'IBS, seppur la differenza non è risultata statisticamente significativa (**Tabella 2A**).

**Tabella 2A:** Test della differenza minima significativa (LSD) di Fisher sugli indici di  $\alpha$ -diversità in campioni fecali.

Microbiota fecale		
	Media	p-value
<b>Indice di Shannon</b>		
<i>CTRL</i>	5.14	0.284
<i>IBS</i>	4.92	
<b>Indice di Chao1</b>		
<i>CTRL</i>	365.05	0.108
<i>IBS</i>	292.24	

p-value < 0.05

Le analisi della  $\beta$ -diversità, effettuate da algoritmi UniFrac ponderati e non ponderati, hanno mostrato una separazione non significativa tra il gruppo CTRL e IBS (**Figura 1A**); risultato confermato dal test PERMANOVA eseguiti su CTRL vs. IBS (PERMANOVA  $p=0.13$ ).



**Figura 1A:** Grafico PCoA di campioni fecali di IBS e CTRL, utilizzando l'algoritmo UniFrac ponderato (A) e non-ponderato (B).

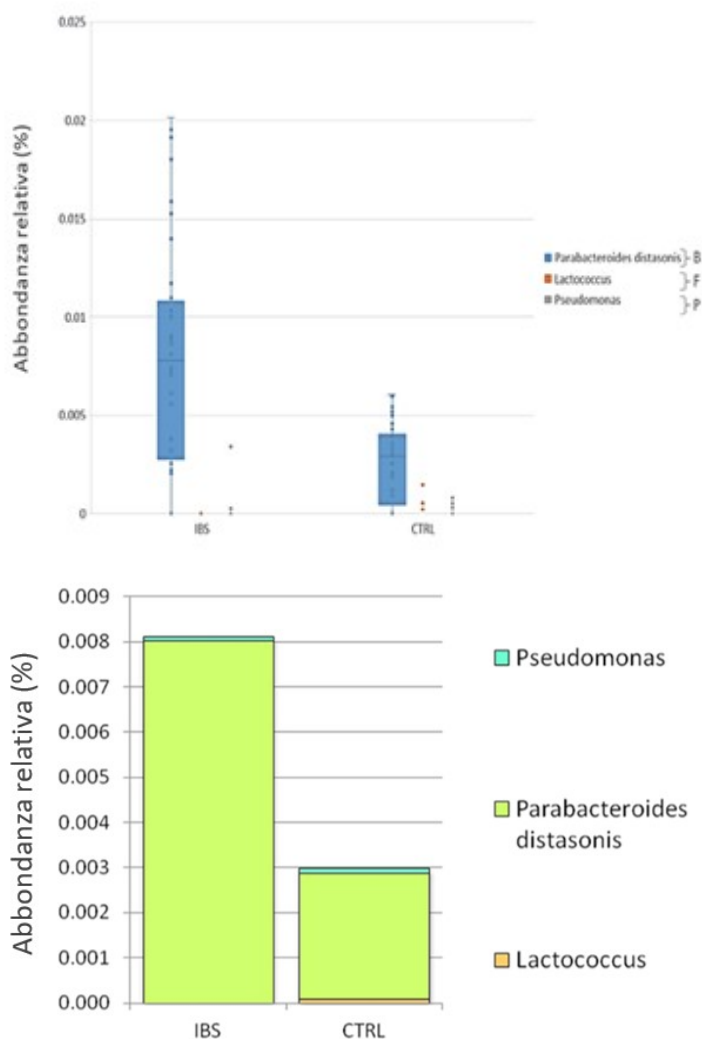
Il test di Kruskal-Wallis, effettuato su OTU raggruppate a livello tassonomico di phylum batterici, ha mostrato un aumento significativo di Bacteroidetes nei campioni fecali IBS rispetto ai CTRL ( $p<0.05$ ). Il test di Kruskal-Wallis, effettuato su OTU raggruppate a livello tassonomico di generi/specie batteriche, ha mostrato che nei campioni fecali IBS la specie Parabacteroides distasonis (Bacteroidetes) era aumentata, mentre Lactococcus (Firmicutes) e Pseudomonas (Proteobacteria) erano ridotti rispetto ai CTRL ( $p<0.05$ ) (**Figura 2A e Tabella 2A**).

*Silvia Cocca*

Phylum	Genus/Species	IBS	CTRL	P value
Firmicutes	<i>Lactococcus</i>	0.00000	0.00008	0.03146
Bacteroidetes	<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.00801	0.00279	0.03343
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0.00010	0.00011	0.04235

**Tabella 2A:** Test

di Kruskal-Wallis su campioni fecali. Nella tabella sono riportati i valori medi di ciascun OTU per il gruppo IBS e CTRL. Sono stati riportati solo OTU che mostravano  $p < 0,05$ .



**Figura 2A:** Grafico a barre per il confronto IBS vs CTRL. Test di Kruskal-Wallis su OTUs raggruppati a livello tassonomico di generi/specie per IBS e CTRL, in campioni fecali. Sono stati riportati solo OTU che hanno mostrato  $p < 0,05$ .

## - Composizione e distribuzione del microbiota mucosale

Un totale di 81.686,00 letture di sequenziamento è stato ottenuto dai 89 campioni di mucosa. Allo stesso modo per i campioni di feci, le differenze di microbiota in IBS e CTRL sono state misurate con l' $\alpha$  e  $\beta$  diversità. L'analisi dell' $\alpha$  diversità, relativa alla ricchezza/biodiversità del microbiota, effettuata utilizzando gli indici di Shannon e Chao I (test per confronti appaiati tra

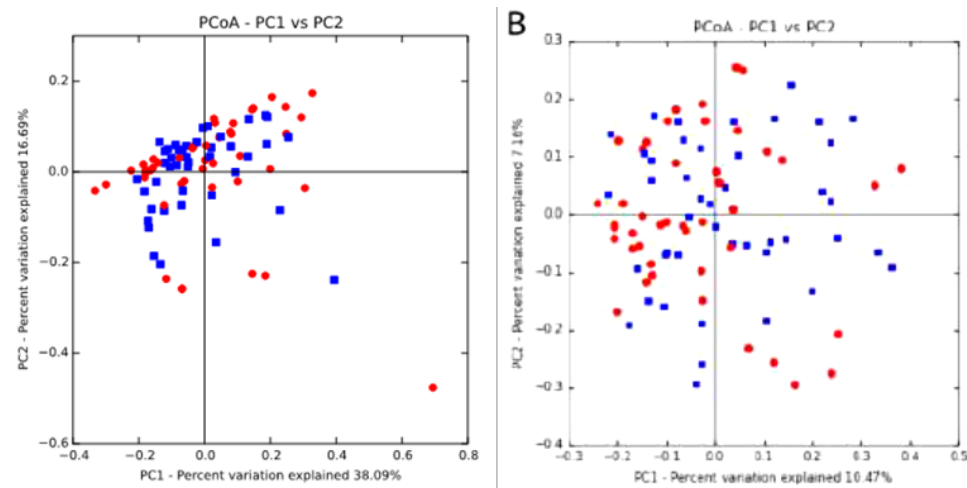
medie per verificare se la differenza tra due medie superi o meno il valore LSD=differenza minima significativa), ha mostrato una riduzione della diversità microbica dai CTRL all'IBS, seppur la differenza non è risultata statisticamente significativa (**Tabella 3A**).

**Tabella 3A:** Test della differenza minima significativa (LSD) di Fisher sugli indici di  $\alpha$ -diversità in campioni mucosali.

		Biopsia	
		Media	p-value
<b>Indice di Shannon</b>			
	<i>CTRL</i>	4.25	0.649
	<i>IBS</i>	4.16	
<b>Indice di Chao1</b>			
	<i>CTRL</i>	156.29	0.367
	<i>IBS</i>	140.17	

p-value < 0.05

Le analisi della  $\beta$ -diversità, effettuate da algoritmi UniFrac ponderati e non ponderati, hanno mostrato una separazione non significativa tra il gruppo CTRL e IBS (**Figura 3A**); risultato confermato dal test PERMANOVA eseguito su CTRL vs. IBS (PERMANOVA p=0.092).

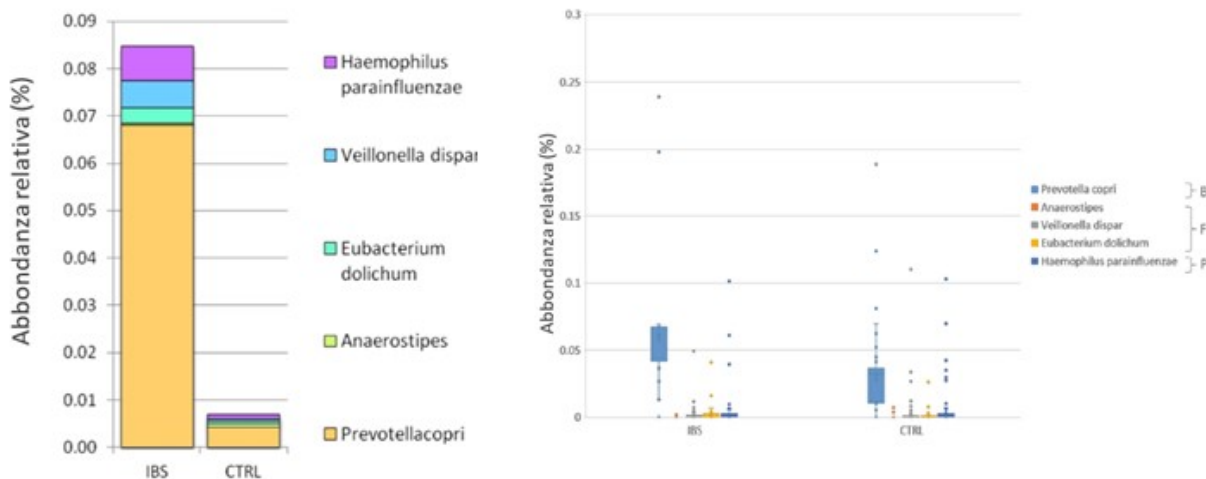


**Figura 3A:** Grafico PCoA di campioni fecali di IBS e CTRL, utilizzando l'algoritmo UniFrac ponderato (A) e non-ponderato (B).

Il test di Kruskal-Wallis, effettuato su OTU raggruppate a livello tassonomico di phylum batterici, ha mostrato un aumento significativo di Bacteroidetes nei campioni di mucosa IBS rispetto ai CTRL (p<0.05). A livello di genere / specie batteriche, il test di Kruskal-Wallis ha mostrato un aumento di Prevoletta copri, Eubacterium dolichum, Veillonella dispar e Haemophilus parainfluenzae e una riduzione di Anaerostipets nei campioni IBS rispetto ai CTRL (p<0.05) (**Figura 4A e Tabella 4A**).

**Tabella 4A: Test di Kruskal-Wallis su campioni mucosali.** Nella tabella sono riportati i valori medi di ciascun OTU per il gruppo IBS e CTRL. Sono stati riportati solo OTU che mostravano  $p < 0,05$ .

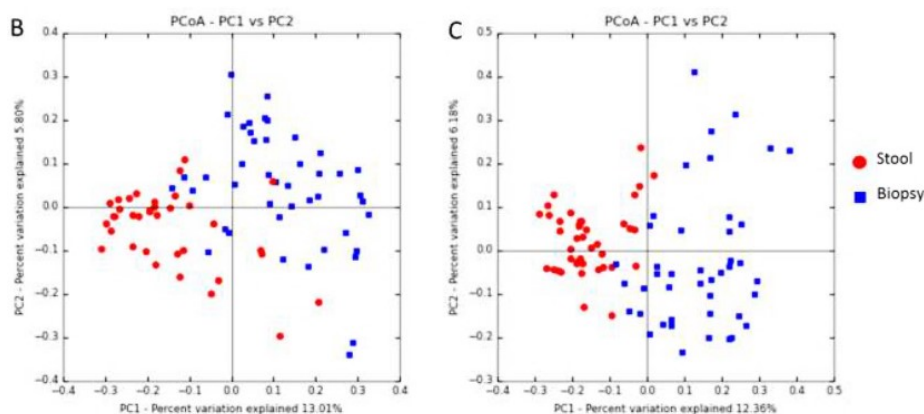
Phylum	Genus/Species	IBS	CTRL	P value	pFDR
Bacteroidetes	<i>Prevotella copri</i>	0.06808	0.00439	0.03209	0.86937
Firmicutes	<i>Anaerostipes</i>	0.00033	0.00075	0.01004	0.73069
Firmicutes	<i>Eubacterium dolichum</i>	0.00334	0.00054	0.00323	0.73069
Firmicutes	<i>Veillonella dispar</i>	0.00572	0.00049	0.03477	0.86937
Proteobacteria	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0.00719	0.00082	0.02662	0.86937



**Figura 4A: Grafico a barre per il confronto IBS vs CTRL.** Test di Kruskal-Wallis su OTUs raggruppati a livello tassonomico di generi/specie per IBS e CTRL, in campioni mucosali. Sono stati riportati solo OTU che hanno mostrato  $p < 0.05$

### - Confronto tra microbiota fecale e di mucosa

Le analisi della  $\beta$ -diversità non ponderate e ponderate hanno mostrato una chiara e significativa separazione tra i campioni di mucosa e feci in CTRL e IBS (**Figura 5A**).



**Figura 5A: Grafico PCoA di campioni fecali e di mucosa di IBS (A) e CTRL (B), utilizzando l'algoritmo UniFrac non-ponderato (B).**



A livello di phylum, la distribuzione dei Firmicutes e degli Actinobacteria è aumentata, mentre i Bacteroidetes e i Proteobacteria sono risultati diminuiti nelle feci di entrambi i gruppi (pFDR <0,05, dati non mostrati).

Il Verrucomicrobia phyla è risultato più alto nelle feci in entrambi i gruppi, rispetto ai campioni di mucosa (pFDR <0,05) e molto più abbondante nei campioni di feci del gruppo IBS, rispetto ai CTRL (**Tabella 5A**).

CTRL					
Phylum	OTUs	Biopsia	Feci	P-value	pFDR
<b>Bacteroidetes</b>	<i>Bacteroides</i>	0.41837	0.10835	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
	<i>Bacteroides Fragilis</i>	0.01632	0.01514	<b>0.00165</b>	<b>0.01851</b>
	<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.01412	0.00279	<b>0.00462</b>	<b>0.04206</b>
<b>Firmicutes</b>	<i>Clostridiaceae</i>	0.00050	0.01060	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
	<i>Lachnospiraceae</i>	0.02992	0.01368	<b>0.00018</b>	<b>0.00345</b>
	<i>Oscillospira</i>	0.01173	0.03036	<b>0.00072</b>	<b>0.00951</b>
	<i>Ruminococcaceae</i>	0.05679	0.25211	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
	<i>Ruminococcus</i>	0.00885	0.02568	<b>0.00135</b>	<b>0.01567</b>
<b>Proteobacteria</b>	<i>Sutterella</i>	0.02039	0.00326	<b>0.00000</b>	<b>0.00001</b>
IBS					
Phylum	OTUs	Biopsia	Feci	P-value	pFDR
<b>Bacteroidetes</b>	<i>Bacteroides</i>	0.37080	0.14358	<b>0.00000</b>	<b>0.00002</b>
	<i>Bacteroides Fragilis</i>	0.01479	0.03195	<b>0.00492</b>	<b>0.04716</b>
	<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.00916	0.01752	<b>0.00169</b>	<b>0.02137</b>
<b>Firmicutes</b>	<i>Clostridiaceae</i>	0.00035	0.01074	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
	<i>Lachnospiraceae</i>	0.03949	0.01074	<b>0.00005</b>	<b>0.00111</b>
	<i>Oscillospira</i>	0.01279	0.02601	<b>0.00234</b>	<b>0.02660</b>
	<i>Ruminococcaceae</i>	0.04894	0.20046	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
	<i>Ruminococcus</i>	0.00667	0.01082	<b>0.00014</b>	<b>0.00257</b>
<b>Proteobacteria</b>	<i>Sutterella</i>	0.01572	0.00682	<b>0.00000</b>	<b>0.00004</b>
<b>Verrucomicrobia</b>	<i>Akkermansia muciniphila</i>	0.00008	0.01884	<b>0.00016</b>	<b>0.00269</b>

**Tabella 5A:** Test di Kruskal-Wallis su biopsia colica vs campioni di feci in gruppi CTRL e IBS. Nella tabella sono riportati i valori medi di ciascun OTU per entrambi i gruppi, filtrati per pFDR <0,05 e abbondanza relativa > 0,01.

La composizione del microbiota, valutata mediante test di Kruskal-Wallis su OTU relativi alla distribuzione di generi/specie batteriche, (filtrata per  $pFDR < 0,05$  e abbondanza relativa  $> 0,01$ ), ha mostrato un profilo simile in entrambi i gruppi, sia per i campioni di feci che per quelli di mucosa. In particolare, in entrambi i gruppi, *Bacteroides* e *Lachnospiraceae* erano più elevati nei campioni di mucosa, mentre *Clostridiaceae*, *Oscillospira*, *Ruminococcaceae* e *Sutterella* erano più alti nelle feci (**Figura 6A**).

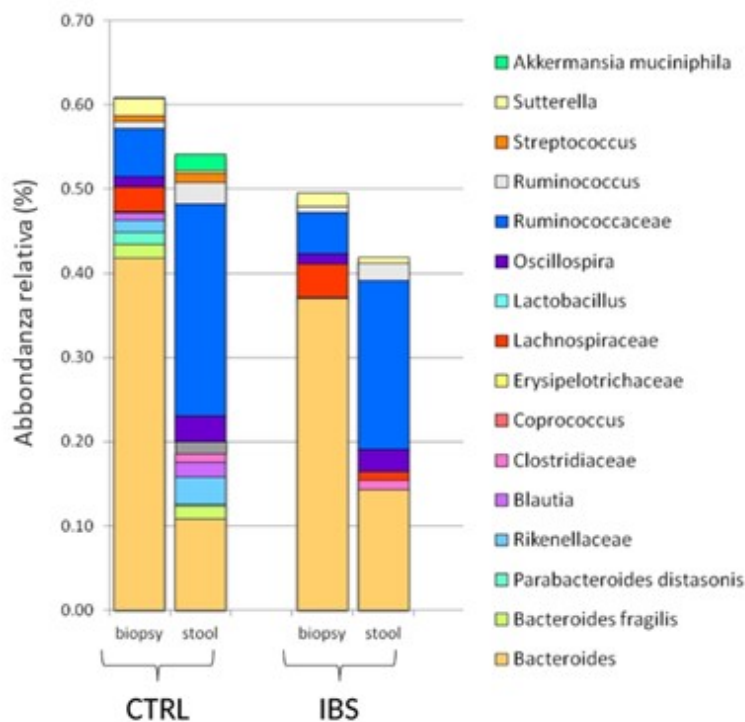
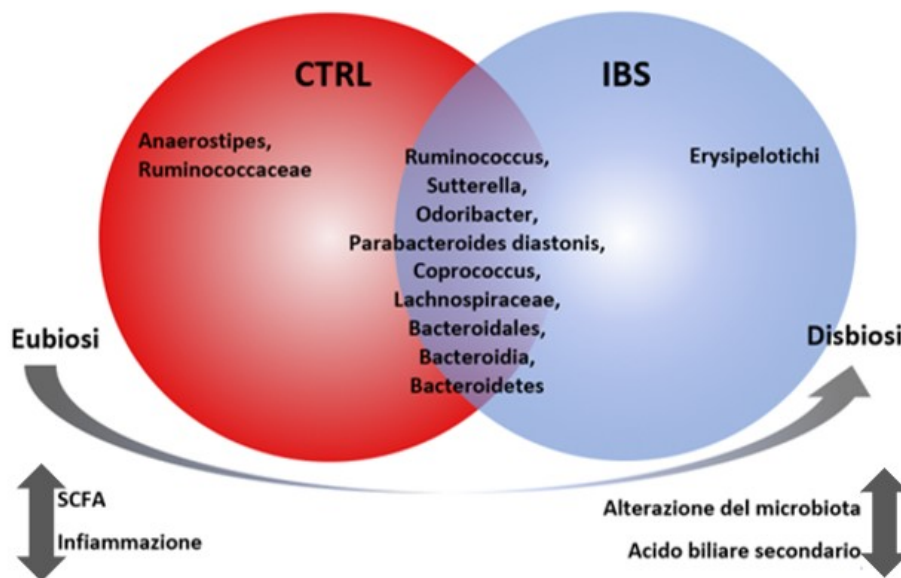


Figura 6A: Grafico a barre che riporta i risultati dei Test di Kruskal-Wallis su OTU di generi/specie batteriche in campioni fecali e di mucosa, per IBS e CTRL.

### - Confronto della composizione tassonomica secondo lo stato della malattia da LEfSe per il biomarcatore metagenomico 16S basato su rRNA

Il confronto tra i due gruppi, effettuata mediante LEfSe, relativi alla composizione tassonomica eseguita su campioni di mucosa, ha permesso di selezionare le OTU associate esclusivamente ai due singoli gruppi e quelle condivise tra i due gruppi CTRL e IBS. Attraverso l'analisi LEfSe, *Anaerostipes* e *Ruminococcaceae* sono stati identificati come potenziali biomarcatori per il microbiota mucosale dei CTRL ed *Erysipelotrichi* per il microbiota mucosale di IBS, mentre *Ruminococcus*, *Sutterella*, *Odoribacter*, *Parabacteroides distasonis*, *Coprococcus*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroidales*, *Bacteroidia* e *Bacteroidetes* sono stati identificati in CTRL e IBS.

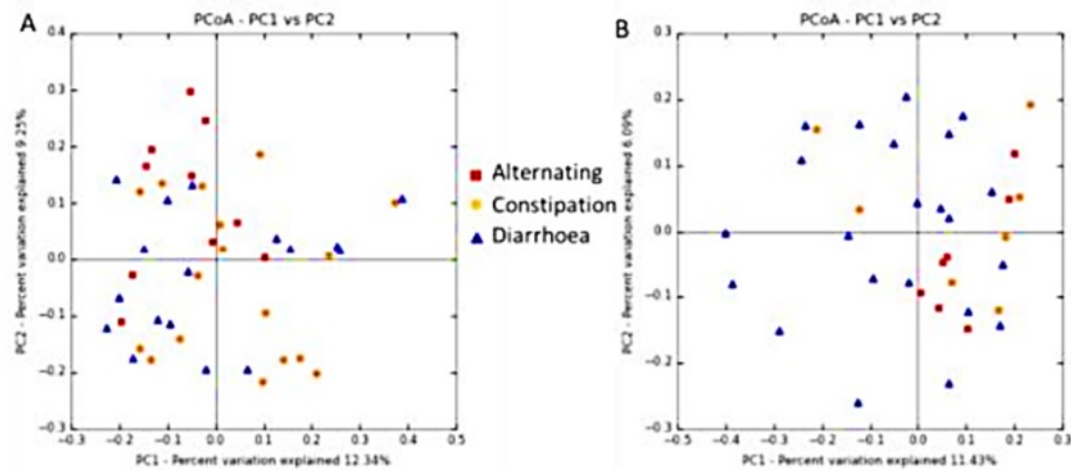
L'analisi LefSe ha confermato i risultati del test Kruskal-Wallis per Ruminococcaceae, *P. distasonis*, Coprococcus e Lachnospiraceae (**Figura 7A**).



**Figura 7A:** Modello descrittivo della composizione del microbiota e il suo ruolo a partire dall'eubiosi alla disbiosi sulla base di campioni di biopsia. Il modello suggerisce che, in condizioni di eubiosi, OTU specifiche compongono il microbiota e mantengono l'equilibrio omeostatico. Un'alterazione del microbiota provoca l'infiammazione, portando ad un incremento di Erysipelotrichi e una riduzione della produzione di acido biliare secondario, con la conseguenza della disbiosi.

### - Profili microbici intestinali e funzionalità cliniche in IBS

L'analisi non ponderata e ponderata della  $\beta$ -diversità in biopsie coliche e campioni fecali in pazienti con IBS, stratificati per l'alvo intestinale predominante (IBS-D, IBS-S e IBS-M), non ha mostrato alcun raggruppamento significativo (analisi ponderata su biopsia e feci: PERMANOVA  $p=0,206$  e  $p=0,091$ , rispettivamente; analisi non ponderata su biopsia e feci: PERMANOVA  $p=0,509$  e  $p=0,251$ , rispettivamente) (**Figure 8A**).



**Figura 8A:** Grafico PCoA di campioni IBS stratificati per caratteristiche cliniche, utilizzando l'algoritmo UniFrac non ponderato. Nel pannello A sono riportati i campioni di mucosa e nel pannello B i campioni fecali, stratificati per le principali abitudini intestinali.

## - PARTE B: Risultati dello studio indagine alimentare e sintomatologia

### Popolazione di studio per le indagini alimentari e sintomatologiche

Sono state valutate le abitudini alimentari di n.49 soggetti adulti, suddivisi in n. 28 pazienti con IBS (57%), stratificati in sottotipi di malattia [n. 9 pazienti con IBS-S; n. 11 pazienti con IBS-D; n. 8 pazienti con IBS-M], e n. 21 CTRL sani (43%). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nel BMI medio tra i pazienti IBS e CTRL (Tabella 1B).

**Tabella 1B:** Caratteristiche antropometriche dei pazienti IBS e CTRL. (mediana)

	CTRL (N=21) 57%	IBS (N=28) 43%	p-value <sup>b</sup>
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)<sup>a</sup></b>	24.99 ± 3.2	27.08 ± 5.2	NS
Normopeso, N(%)	8 (38)	11 (39)	-
Sovrappeso, N(%)	11 (52)	11 (39)	-
Obeso, N(%)	2 (10)	6 (22)	-

<sup>a</sup> Media ± deviazione standard; <sup>b</sup> u-test di Mann-Whitney (p<0.05)

NS, non significativo

I valori di BMI ottenuti hanno rilevato che la popolazione CTRL presenta un BMI medio normopeso (24.99±3.23), rispetto alla popolazione IBS sovrappeso (27.08 (±5.22)). Sebbene il calcolo del BMI medio tra i due gruppi non sia risultato statisticamente significativo, si è notata una prevalenza superiore di obesità in pazienti IBS (22%) rispetto ai CTRL (10%).

## - Sintomi gastrointestinali prevalenti

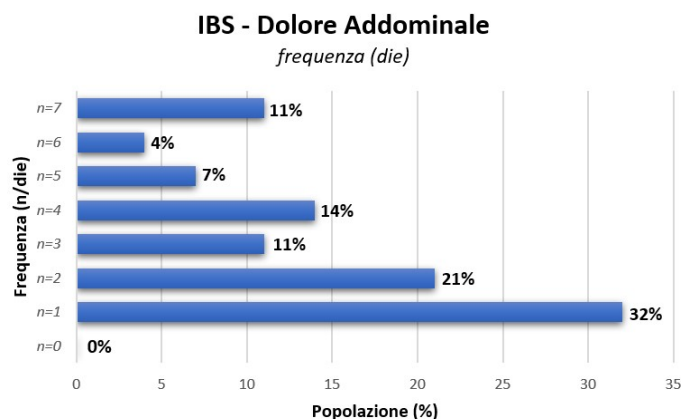
Ai pazienti IBS è stato somministrato un questionario sintomatologico per la valutazione della consistenza delle feci, la frequenza evacuativa e i sintomi gastrointestinali, come il dolore addominale e la flatulenza, i quali erano tenuti a descrivere la frequenza giornaliera della comparsa del sintomo e la percezione soggettiva del grado di intensità del dolore/fastidio in una scala di intensità da 0 a 10.

Attraverso l'illustrazione della Bristol Stool Scale, raffigurata sul questionario sintomatologico, per la valutazione della consistenza delle feci e la frequenza evacuativa, è stato possibile suddividere la popolazione IBS in tre sottotipi di malattia. La suddivisione dei pazienti IBS è riportata in **Tabella 2B**.

**Tabella 2B:** Distribuzione dei pazienti IBS in sottotipi di malattia.

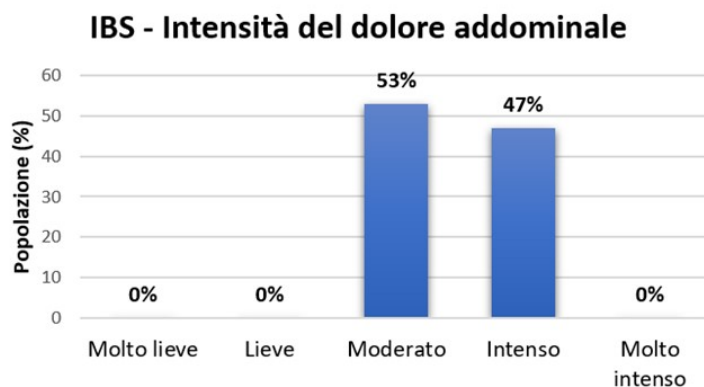
<b>IBS (N=28)</b>			
	<b>IBS-S (N=9)</b> 32%	<b>IBS-D (N=11)</b> 39%	<b>IBS-M (N=8)</b> 29%
<b>Maschi, N(%)</b>	2 (22)	5 (45)	2 (25)
<b>Femmine, N(%)</b>	7 (78)	6 (55)	6 (75)
<b>Frequenza di feci</b>			
<b>0 def/die, N(%)</b>	6 (67)	-	1 (12.5)
<b>1 def/die, N(%)</b>	3 (33)	1 (9)	3 (37.5)
<b>2 def/die, N(%)</b>	-	4 (36)	2 (25)
<b>3 def/die, N(%)</b>	-	5 (46)	1 (12.5)
<b>4 def/die, N(%)</b>	-	1 (9)	-
<b>5 def/die, N(%)</b>	-	-	1 (12.5)

Da come si evince nel grafico sottostante (Grafico 1B), il 32% della popolazione IBS lamenta il dolore addominale solamente n.1 volta al giorno, il 21% n.2 volte al giorno, il 14% n.4 volte al giorno, l'11% n.3 e n.7 volte al giorno, il 7% n.5 volte al giorno e il 4% n.6 volte al giorno. Stratificando i risultati per sottotipo di malattia, abbiamo notato una prevalenza di pazienti IBS-M e IBS-D che denunciano una maggiore frequenza di dolore addominale giornaliero [da 4 a 7 n/die], soprattutto nei periodi post-prandiali (dati non mostrati).



**Grafico 1B:** Suddivisione dei pazienti IBS in base alla frequenza del dolore addominale.

Considerando la scala di intensità del dolore addominale percepito dai soggetti IBS, il 53% dei pazienti IBS percepisce il dolore con grado “moderato” (grado 4-5-6), il 47% con grado “intenso” (grado 7-8), mentre nessuno con grado “molto lieve” (grado 0-1), “lieve” (grado 2-3) e “molto intenso” (grado 9-10) (**Grafico 2B**) Stratificando i risultati per sottotipo di malattia, la maggioranza dei pazienti IBS-D (n.9) avverte un dolore addominale “moderato” e “intenso”, rispetto agli altri due sottotipi, mentre solo 1 soggetto IBS-M avverte un dolore “molto intenso” (dati non mostrati).



**Grafico 2B:** Scala di intensità del dolore addominale.

Infine per quanto riguarda il meteorismo, nel grafico sotto riportato si osserva che il 32% della popolazione IBS sostiene di sviluppare flatulenza n.7 volte al giorno, il 18% n.6 volte al giorno, il 14% n.5 e n.3 volte al giorno, il 4% n.4 volte al giorno, l'11% n.2 volte al giorno e il 7% n.1 volta al giorno. In particolar modo, un numero maggiore di pazienti IBS-D (n.6), rispetto agli altri due sottotipi di malattia, mostrano una maggiore frequenza della flatulenza nell'arco della giornata [da 5 a 7 n/die], soprattutto nei periodi post-prandiali (dati non mostrati).

## - Abitudini alimentari dei pazienti IBS

I risultati ottenuti mediante l'utilizzo del diario alimentare, che ha permesso di calcolare i valori medi giornalieri di Kcal, carboidrati, lipidi, proteine e fibre, non hanno rivelato differenze statisticamente significative tra i gruppi. È stato possibile notare una differenza statisticamente significativa tra il gruppo CTRL e i sottogruppi di IBS relativa all'aderenza della Dieta Mediterranea (MD), valutata secondo il "Mediterranean Diet Serving Score" (MDSS), validato da Monteagudo et al., 2015. Le caratteristiche alimentari dei pazienti CTRL e IBS sono riportate in Tabella 3B.

**Tabella 3B:** Caratteristiche alimentari dei pazienti IBS e CTRL. (mediana)

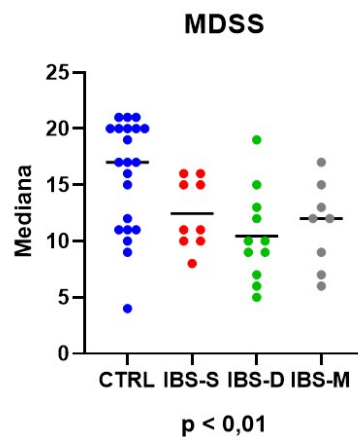
	IBS (N=28)				p-value <sup>b</sup>
	CTRL (N=21)	IBS-S (N=9)	IBS-D (N=11)	IBS-M (N=8)	
<b>Energia (Kcal/g)</b>	1425	1509	1445	1540	NS
<b>Carboidrati</b>					
<i>gr/die</i>	199	174	173	164.5	NS
<i>Energia (%/kcal)</i>	49	47	48	44.5	NS
<b>Lipidi</b>					
<i>gr/die</i>	60	54	55	60	NS
<i>Energia (%/kcal)</i>	34	37	37	38	NS
<b>Proteine</b>					
<i>gr/die</i>	62	57	65	62.5	NS
<i>Energia (%/kcal)</i>	16	15	16	17	NS
<b>Fibra (gr)</b>	14	12	11	13.5	NS
<b>MDSS</b>	17	11	10	12	<b>&lt;0.01</b>

<sup>b</sup> test di Kruskal-Wallis (p<0.05)  
NS, non significativo

Come citato poc'anzi, il MDSS ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra le mediane dei gruppi quattro diversi gruppi (p<0.01) (**Figura 2B**).



**Figura 2B:** Scatter dot plot del MDSS nei pazienti CTRL, IBS-S, IBS-D e IBS-M. Tutti i soggetti IBS mostrano un punteggio mediano di aderenza alla dieta mediterranea più basso rispetto ai CTRL.



Stratificando la popolazione IBS nei tre sottotipi di malattia, è possibile notare una similarità nel comportamento alimentare, poiché la maggioranza dei pazienti IBS mostra un basso livello di aderenza al regime mediterraneo, rispetto ai CTRL (**Tabella 4B**).

**Tabella 4B:** Distribuzione della popolazione in studio per punteggio di aderenza alla Dieta Mediterranea. MDSS: Cut-off  $\geq 16$  (da Montegaudo et al.2015)

<b>Mediterranean Diet Serving Score (MDSS)</b>			
	<b>MDSS <math>\leq 16</math></b>	<b>MDSS <math>\geq 16</math></b>	<b>p- value<sup>b</sup></b>
<b>CTRL</b> (n=21), N (%)	8 (38)	13 (62)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>IBS</b> (n=28), N (%)	24 (86)	4 (14)	<b>&lt;0.0005</b>
<b>IBS-S</b> (n=9), N(%)	7 (78)	2 (22)	NA
<b>IBS-D</b> (n=11), N(%)	10 (91)	1 (9)	NA
<b>IBS-M</b> (n=8), N(%)	7 (88)	1 (12)	NA

u-test di Mann-Whitney (p<0.05)  
NA, non applicabile

### - Confronto abitudini alimentari e sintomatologia clinica

Considerando che la quasi totalità della popolazione IBS in studio non consuma quotidianamente prodotti ortofrutticoli (frutta e verdura), ritenuti i principali responsabili dell'insorgenza e peggioramento dei sintomi gastrointestinali per le fibre alimentari in essi



contenute, abbiamo osservato che il dolore addominale e la flatulenza continuavano a persistere nei pazienti IBS, anche se seguivano un regime dietetico con restrizione di molteplici alimenti vegetali e integrali. In seguito a tali considerazioni, abbiamo riassunto le categorie alimentari e gli alimenti che, in base a quello che pazienti IBS avevano riportato sul diario alimentare, provocavano maggiormente dolore addominale e flatulenza nel post-prandiale.

I risultati dalla nostra indagine osservazionale sono illustrati nella **Tabella 5B**.

**Tabella 5B:** lista degli alimenti ritenuti responsabili dell'insorgenza dei sintomi gastrointestinali dai pazienti IBS.

<b>Alimenti</b>	
<b>Cereali e derivati</b>	Cereali contenenti glutine*, pizza*, focaccia*, brioche*, dolci confezionati*, snack zuccherati* e altri prodotti derivanti il frumento*
<b>Prodotti vegetali</b>	Verdura cruda (finocchio*, sedano), carciofi*, asparagi*, cicoria, melanzane, peperoni, arancia, frutta secca*, legumi* (fagioli)
<b>Latticini</b>	Latte vaccino*, formaggi freschi*, formaggi duri e stagionati, gelati*
<b>Prodotti animali</b>	Salame, mortadella, salsicce, wurstel e altri alimenti derivanti il maiale
<b>Bevande</b>	Caffè, tè, bevande gassate zuccherate, alcolici
<b>Altri alimenti</b>	Alimenti fritti, salse (maionese), snack salati (patatine), dolcificanti a base di fruttosio*
<i>*Gli alimenti contrassegnati corrispondono ai prodotti ad alto contenuto di FODMAP</i>	

Molti dei pazienti hanno dichiarato sul diario alimentare di aver eliminato dalla propria dieta alimenti ricchi in grassi, frittture, lieviti, insaccati, prodotti lattiero-caseari, ma ciò non è stato riscontrato valutando i loro diari alimentari; il che deduce a una scarsa cultura merceologica in ambito alimentare, conseguente a una mancata educazione alimentare e nutrizionale.

## **PARTE C: Risultati dello studio dell'analisi metagenomica di pazienti IBS e CTRL, correlata all'alimentazione**

Suddivisione dei pazienti IBS e CTRL in base al livello di assunzione di riferimento nazionali (LARN). Abbiamo suddiviso i pazienti IBS e CTRL in sottogruppi aderenti (In-LARN) e non aderenti (Out-LARN) all'assunzione di carboidrati, lipidi e proteine rispetto ai Livelli di

Assunzione di Riferimento dei Nutrienti (LARN) della Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU, IV Edizione 2014) (**Tabella 1C**).

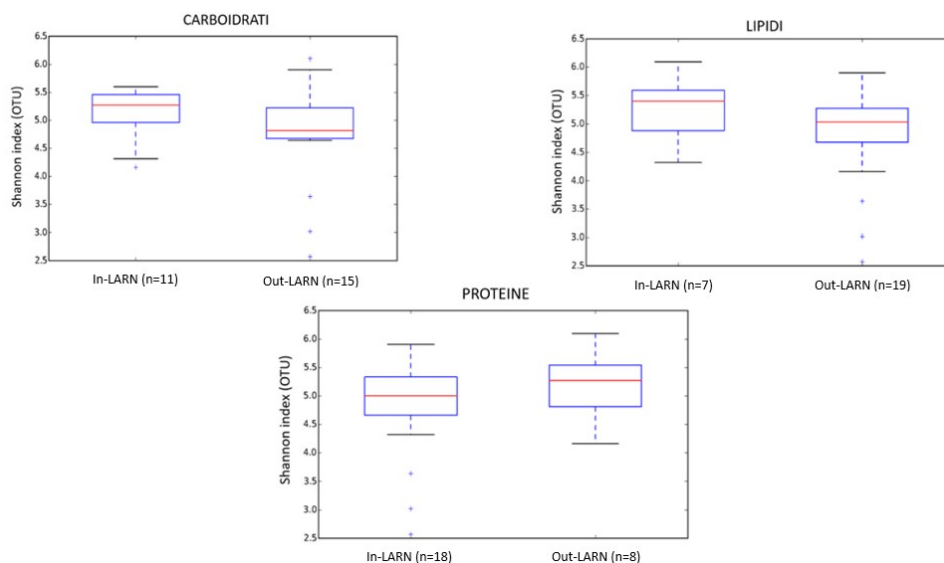
**Tabella 1C:** *Suddivisione della popolazione in studio per livello di aderenza ai LARN (SINU, 2014)*

<b>LIVELLI DI ASSUNZIONE DEI NUTRIENTI</b>			
<b>Carboidrati</b> (45-60%)	<b>CTRL</b>	<b>IBS</b>	<b>p- value<sup>b</sup></b>
In-LARN, N (%)	12	12	
Out-LARN, N (%)	9	16	
<b>Lipidi</b> (20-35%)	<b>CTRL</b>	<b>IBS</b>	<b>p- value<sup>b</sup></b>
In-LARN, N (%)	16	9	
Out-LARN, N (%)	5	19	
<b>Proteine</b> (≥15%)	<b>CTRL</b>	<b>IBS</b>	<b>p- value<sup>b</sup></b>
In-LARN, N (%)	14	18	
Out-LARN, N (%)	7	10	

<sup>b</sup> u-test di Mann-Whitney (p<0.05)  
NA, non applicabile

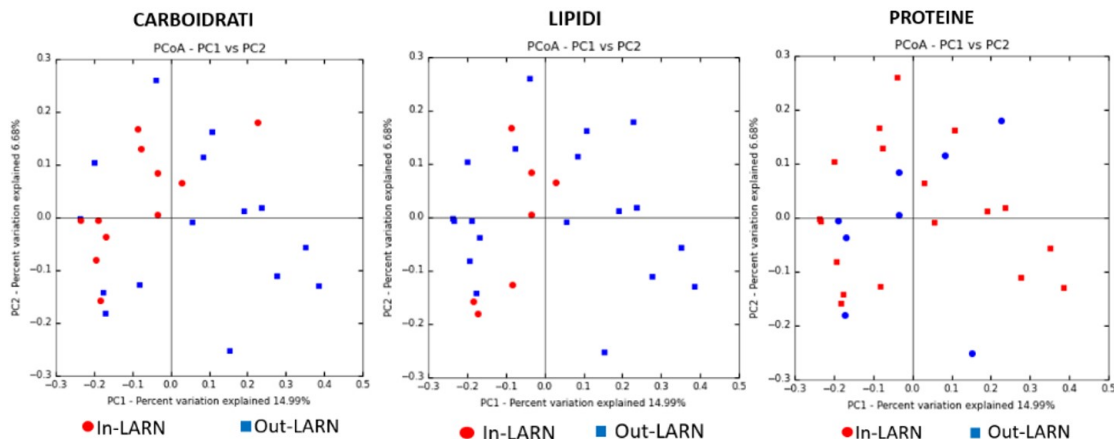
### - Analisi metagenomica di campioni fecali correlata alla dieta in pazienti IBS

Le analisi dell' $\alpha$  diversità, valutata mediante l'Indice di Shannon (t-test), del microbiota fecale di pazienti IBS che rispettano i livelli di assunzione di riferimento nazionali (In-LARN) dei macronutrienti, rispetto ai pazienti IBS che non rispettano tali fabbisogni (Out-LARN), non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi per i carboidrati (p=0.197), lipidi (p=0.171) e proteine (p=0.236) (**Figura 1C**).



**Figura 1C:** Analisi dell' $\alpha$ -diversità. Indice di Shannon basato sull'abbondanza di OTUs tra pazienti IBS che hanno uno squilibrio nell'assunzione di carboidrati, lipidi e proteine, rispetto ai pazienti IBS che hanno un'adequata assunzione di tali macromolecole.

Le analisi della  $\beta$ -diversità, effettuate da algoritmi UniFrac non ponderati, hanno mostrato una separazione non significativa tra i due gruppi IBS In-LARN e Out-LARN (Figura 2C); risultato confermato dai test PERMANOVA eseguiti su carboidrati (PERMANOVA  $p=0.079$ ), lipidi (PERMANOVA  $p=0.29$ ) e proteine (PERMANOVA  $p=0.843$ ).



**Figura 2C:** Grafico PCoA dell'analisi non ponderata della  $\beta$ -diversità. Analisi composizionale del microbiota fecale basato sull'abbondanza di OTUs tra pazienti IBS che hanno uno squilibrio nell'assunzione di carboidrati, lipidi e proteine (Out-LARN), rispetto ai pazienti IBS che hanno un'adequata assunzione di tali macromolecole (In-LARN).

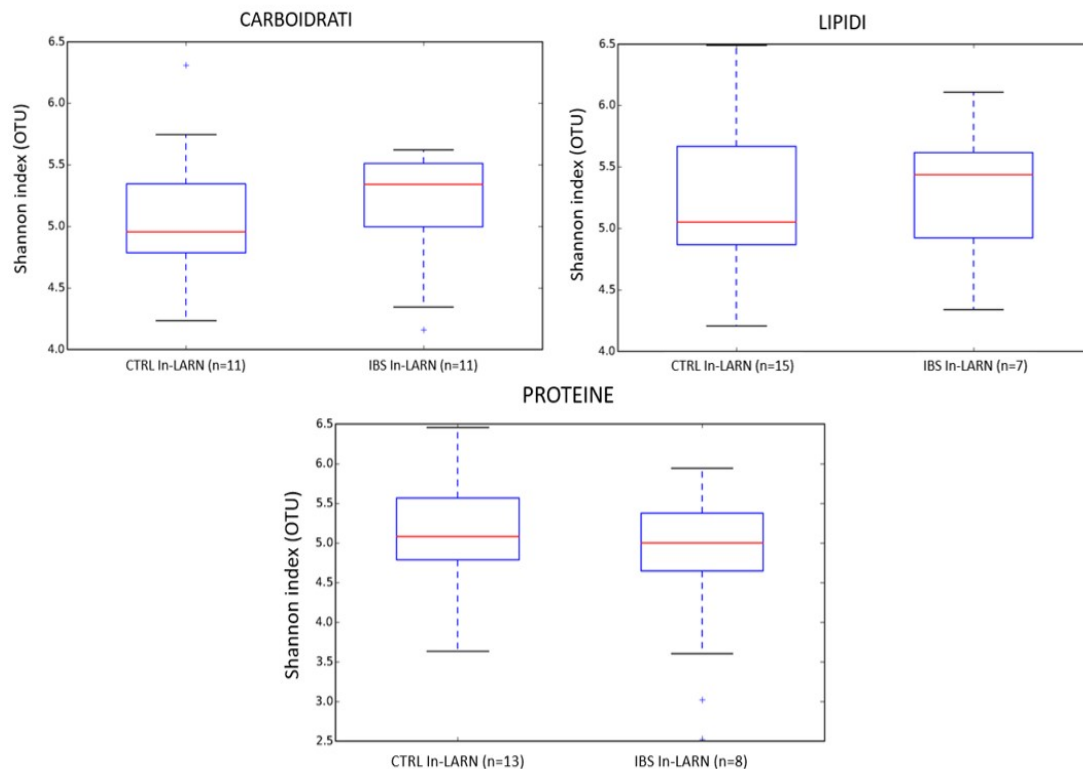
Il test di Kruskal-Wallis, effettuato su OTU raggruppate a livello tassonomico di phylum batterici, non ha mostrato differenze nei pazienti IBS suddivisi nei due gruppi In-LARN e Out-LARN per i carboidrati e proteine. È stata riscontrata una differenza significativa tra i due gruppi per quanto concerne i lipidi, mostrando una riduzione di Bacteroidetes nel gruppo Out-LARN ( $p<0.05$ ) (dati non mostrati). Mentre, l'analisi effettuata a livello tassonomico di generi/specie batteriche, ha mostrato una significativa riduzione di *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium*, *Parabacteroides* e Rikinellaceae nel gruppo Out-LARN dei pazienti IBS, e un aumento di Lactobacillaceae, Clostridiales, Prevotella e Parabacteroides ( $p<0.05$ ) (Tabella 2C).

CARBOIDRATI				
Phylum	Genus /Species	Out-LARN	In-LARN	P value
Firmicutes	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0.033152	0.093945	0.010146
Firmicutes	<i>Lactobacillaceae</i>	0.002333	0	0.038067
Firmicutes	<i>Eubacterium</i>	3.10E-05	0.006294	0.045639
Bacteroidetes	<i>Parabacteroides</i>	0.006229	0.012392	0.020153
LIPIDI				
Phylum	Genus /Species	Out-LARN	In-LARN	P value
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	0.111158	0.224282	0.010099
Bacteroidetes	<i>Rikenellaceae</i>	0.026998	0.072909	0.014001
Firmicutes	<i>Eubacterium</i>	0.000108	0.002184	0.018933
Actinobacteria	<i>Adlercreutzia</i>	1.36E-05	0.000137	0.014733
PROTEINE				
Phylum	Genus /Species	Out-LARN	In-LARN	P value
Firmicutes	<i>Clostridiales</i>	0.124899	0.046281	0.016881
Firmicutes	<i>Veillonellaceae (Dialister)</i>	0.040066	0.023131	0.018473
Bacteroidetes	Prevotella	0.002939	1.95E-05	0.030237
Bacteroidetes	Parabacteroides	0.017884	0.004816	0.047241

#### - Confronto del microbiota fecale tra il gruppo IBS In-LARN e il gruppo CTRL In-LARN

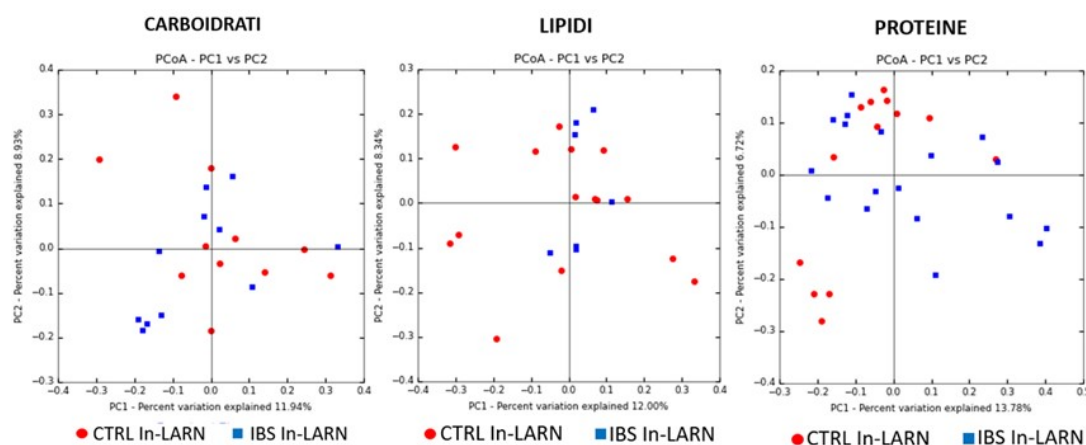
Le analisi dell' $\alpha$  diversità, valutata mediante l'Indice di Shannon (t-test), del microbiota fecale di pazienti IBS e CTRL che rispettano i livelli di assunzione di riferimento nazionali (In-LARN), non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi per i carboidrati ( $p=0.662$ ), lipidi ( $p=0.831$ ) e proteine ( $p=0.192$ ) (**Figura 3C**).





**Figura 3C:** Analisi dell' $\alpha$ -diversità. Indice di Shannon basato sull'abbondanza di OTUs tra pazienti IBS e CTRL del gruppo In-LARN per carboidrati, lipidi e proteine.

Le analisi della  $\beta$ -diversità, effettuate da algoritmi UniFrac non ponderati, hanno mostrato una separazione non significativa tra i due gruppi In-LARN di pazienti IBS e CTRL (**Figura 4C**); risultato confermato dai test PERMANOVA eseguiti su carboidrati (PERMANOVA  $p=0.047$ ), lipidi (PERMANOVA  $p=0.73$ ) e proteine (PERMANOVA  $p=0.232$ ).



**Figura 4C:** Grafico PCoA dell'analisi non ponderata della  $\beta$ -diversità. Analisi composizionale del microbiota fecale basato sull'abbondanza di OTUs tra pazienti IBS e CTRL che hanno un'adequata assunzione di carboidrati, lipidi e proteine (In-LARN).

Correlando le OTU del microbiota fecale di pazienti IBS del gruppo In-LARN, con il microbiota fecale dei CTRL del gruppo In-LARN, abbiamo osservato una differenza in Bacteroidetes phylum tra i due gruppi, relativa all'assunzione di carboidrati e lipidi ( $p < 0.05$ ) (dati non mostrati).

Il test di Kruskal-Wallis, effettuato su OTU raggruppate a livello tassonomico di generi/specie batteriche, ha rilevato differenze tra i due gruppi In-LARN di pazienti IBS e CTRL per tutte e tre le macromolecole alimentari. Si osserva una riduzione significativa di *Ruminococcus gnavus*, *Roseburia*, *Prevotella copri*, Ruminococcaceae e un aumento di Veillonellaceae, *Streptococcus anginosus*, Rikenellaceae, *Lactobacillus* e *Lachnospira* nel microbiota fecale di pazienti IBS che rispettano i LARN, rispetto ai volontari sani (**Tabella 3C**).

CARBOIDRATI				
Phylum	Genus /Species	IBS In-LARN	CTRL In-LARN	P value
Firmicutes	<i>Ruminococcus gnavus</i>	0.001472	0.004391	0.008799
Firmicutes	<i>Roseburia</i>	0.001049	0.003812	0.03669
Bacteroidetes	<i>Prevotella copri</i>	0.015193	0.000815	0.029758
LIPIDI				
Phylum	Genus /Species	IBS In-LARN	CTRL In-LARN	P value
Firmicutes	<i>Veillonellaceae (Dialister)</i>	0.040022	0.017992	0.011847
Firmicutes	<i>Streptococcus anginosus</i>	0.000145	0	0.034098
Firmicutes	<i>Ruminococcaceae</i>	0.162129	0.270788	0.037574
Bacteroidetes	<i>Rikenellaceae</i>	0.072909	0.031926	0.021966
PROTEINE				
Phylum	Genus /Species	IBS In-LARN	CTRL In-LARN	P value
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	0.008269	0.000109	0.012546
Firmicutes	<i>Lachnospira</i>	0.002341	0.00288	0.01414

**Tabella 3C:** Test di Kruskal-Wallis su campioni fecali in pazienti IBS e CTRL, classificati nel gruppo In-LARN. Nella tabella sono riportati i valori medi di ciascun OTU per il gruppo IBS In-LARN e CTRL In-LARN. Sono stati riportati solo OTU che mostravano  $p < 0.05$ .

## 7.4 Discussione

Il gruppo di pazienti con IBS analizzato in questo studio presentava con maggiore frequenza il sottotipo IBS-D (39%), seguito da IBS-S (32%) e IBS-M (29%). La distribuzione dei sottotipi IBS differisce in diversi studi e probabilmente dipende dalla popolazione valutata, dalla posizione geografica e dalla diagnosi di ciascun sottotipo<sup>39</sup>. La predominanza femminile nel nostro gruppo IBS di studio [30 (68%)] è in accordo con i dati epidemiologici presenti in letteratura che mostrano un rapporto F:M da 2:1 a 4:1<sup>32</sup>. La preponderanza del genere femminile nella popolazione affetta da intestino irritabile potrebbe riflettere la tendenza elevata delle donne nel rivolgersi al medico, piuttosto che l'incidenza reale dell'IBS nella popolazione femminile<sup>32</sup>. Numerosi dati disponibili in letteratura hanno riportato diversi profili di microbiota nei pazienti con IBS, ma quelli che confrontano la flora batterica mucosale e fecale sono ancora carenti o controversi. Come osservato in molteplici studi, le analisi metagenomiche hanno rivelato un profilo microbico a livello di *phylum* diverso tra CTRL e IBS, con una significativa riduzione della ricchezza correlata alla possibile micro-infiammazione intestinale attribuita ai pazienti IBS. In particolare, per quanto concerne il microbiota fecale, nei pazienti IBS la cui assunzione di fibre alimentari risultava ridotta è stato riscontrato un aumento del *phylum* dei Batteroidi<sup>157</sup>, dato che conferma i risultati delle nostre indagini alimentari. A livello di specie batteriche, nel microbiota fecale dei CTRL, le specie più rappresentate sono risultate essere Ruminococcaceae, *Oscillospira* e Lachnospiraceae, mentre nei pazienti IBS il microbiota fecale è stato caratterizzato dalla presenza di *Oscillospira*, che curiosamente è già stata descritta nella mucosa normale o in caso di lieve infiammazione<sup>108</sup>. Osservando la composizione del microbiota associato alla mucosa intestinale, sono stati riscontrati profili microbici simili sia nella mucosa dei CTRL che in quella degli IBS, in termini di *Bacteroides*, Lachnospiraceae e *Coprococcus*. Nel presente studio è stato evidenziato che nel microbiota associato alla mucosa dei pazienti IBS, le specie *Veillonella dispar*, *Prevotella copri* e *Haemophilus parainfluenzae* erano significativamente rappresentate. Questi batteri potrebbero essere coinvolti nella genesi dell'infiammazione a livello mucosale che potrebbe avere un ruolo nella patogenesi dell'IBS. *Prevotella copri* è stato associato ad un'aumentata suscettibilità a disturbi infiammatori, come l'artrite, e allo stato di infiammazione sistemica<sup>116,117</sup>, mentre Kasai *et al* hanno suggerito un possibile ruolo di *Veillonella dispar* nell'infiammazione e nel carcinoma del colon-retto<sup>114</sup>, anche se generalmente è considerato un batterio non patogeno. Inoltre, *V. dispar* ha mostrato la capacità di degradare l'acido colico biliare e il deossicolato in prodotti secondari<sup>130,131</sup>, con conseguente riduzione di tali prodotti a livello colico. Pertanto, la presenza di questa specie associata alla mucosa suggerisce un ruolo di questi batteri nel dismetabolismo degli acidi biliari riportato proprio nei pazienti IBS<sup>132</sup>. Inoltre, la riduzione degli acidi biliari secondari a livello colico

determina la perdita dei loro effetti anti-infiammatori, suggerendo che siano come attori importanti nel prevenire o ridurre i processi pro-infiammatori<sup>128</sup>.

Un altro obiettivo di questo studio era identificare potenziali biomarcatori associati al microbiota della mucosa nei pazienti con IBS e, secondo le analisi LEfSe, sono state identificate le famiglie di *Anaerostipes* e Ruminococcaceae come biomarcatori associati esclusivamente al microbiota di mucosa dei CTRL, che svolgono un ruolo benefico esercitato attraverso la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA)<sup>124</sup>. Al contrario, nel microbiota mucosale dei pazienti IBS è stata identificata esclusivamente la classe degli Erysipelotrichi come potenziale biomarcatore microbico che, in modelli animali risulta elevato solo in seguito alla somministrazione esogena di acido colico, mentre dalle nostra analisi è emerso che tale biomarcatore risulta nettamente aumentato nei pazienti IBS, supportando l'ipotesi di un dismetabolismo di acidi biliari<sup>129,130</sup>. Inoltre, la presenza di Erysipelotrichi è stata associata ad alterazioni del metabolismo lipidico in caso di sovrappeso, obesità, ipercolesterolemia e sindrome metabolica<sup>158</sup>.

Per quanto riguarda l'indagine alimentare e la sintomatologia clinica, il nostro studio ha permesso di osservare che la popolazione IBS presenta mediamente un indice di massa corporea (BMI) aumentato. Sulla base della letteratura attuale, l'associazione tra sovrappeso/obesità e IBS non è chiara, ma potrebbe essere interessante considerare una serie di evidenze che mostrano una maggiore capacità del microbiota obeso ad estrarre sostanze energetiche dagli alimenti ingeriti e ad aumentare l'accumulo di tessuto adiposo nell'ospite<sup>159</sup>.

È importante considerare il punteggio di aderenza alla dieta mediterranea risultato significativamente più basso nei soggetti IBS rispetto ai CTRL, suggerendo una possibile relazione tra la scarsa aderenza alla dieta mediterranea, o diete squilibrate, e l'insorgenza di sintomi gastrointestinali in pazienti con IBS. La stessa considerazione è stata ipotizzata in un recente studio epidemiologico italiano, che ha concluso che una maggiore aderenza alla dieta mediterranea può prevenire i sintomi gastrointestinali<sup>160</sup>, teoria supportata anche in alcune reviews<sup>161</sup>. L'indagine alimentare, correlata alla sintomatologia clinica, ha mostrato che i pazienti con IBS riportano dolore addominale e diarrea a seguito dell'assunzione di alimenti molto ricchi di acidi grassi e alcuni ricchi in FODMAPs, i quali in parte sono considerati responsabili dei disturbi intestinali in IBS<sup>55</sup>. I pasti grassi alterano la motilità intestinale, aumentando il tempo di transito con maggiore esposizione di substrati per i processi fermentativi del microbiota, e inducono una stimolazione riflessa dell'attività motoria del colon (riflesso gastrocolico)<sup>51</sup>, che potrebbe spiegare il dolore addominale, il meteorismo e la defecazione post-prandiale osservata nei pazienti con IBS-D. Dato che la dieta mediterranea (MD) si basa solo in minima parte su alimenti in grado di innescare sintomi gastrointestinali, potrebbe rappresentare un regime dietetico terapeutico per i pazienti con IBS. La



MD è un modello dietetico vario, equilibrato e frazionato in piccoli pasti che possono esercitare effetti benefici in pazienti IBS-D, favorendo lo svuotamento gastrico mediante la fisiologica attivazione del riflesso gastro-colico<sup>51</sup>.

Le analisi metagenomiche che hanno permesso di individuare differenze di microbiota fecale in pazienti IBS suddivisi in gruppi In-LARN e Out-LARN, cioè rispettivamente pazienti che seguono un regime dietetico conforme e non conforme ai LARN, hanno rivelato un profilo microbico a livello di *phylum* diverso tra i due gruppi, per quanto concerne l'assunzione di lipidi, con una significativa riduzione in ricchezza dei *Bacteroidetes* nel gruppo IBS Out-LARN, in linea con i dati precedentemente riportati. La composizione microbica fecale degli IBS, associata all'intake di carboidrati, ha mostrato che le specie *Faecalibacterium prausnitzii*, *Parabacteroides* ed *Eubacterium* sono meno rappresentati nel microbiota fecale di pazienti IBS del gruppo Out-LARN, mentre si è osservato un aumento di *Lactobacillaceae*. Il *F. prausnitzii* costituisce il 5% del microbiota fecale totale di adulti sani<sup>74</sup>, ed è in grado di produrre notevoli quantità di butirrato dai processi fermentativi glucidici<sup>162</sup>. Il butirrato è un metabolita essenziale che ha effetti pleiotropici nel ciclo vitale dei colonociti e numerosi effetti benefici, tra i quali mantenere l'integrità di barriera, prevenire il passaggio di agenti patogeni, modulare il sistema immunitario e ridurre la progressione del tumore colon-rettale<sup>162</sup>. Sokol *et al* hanno dimostrato che *F. prausnitzii* riduce l'espressione delle citochine pro-infiammatorie, come IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12<sup>163</sup>, stimolando la produzione di citochine anti-infiammatorie, come IL-10, che sono generalmente diminuite in pazienti con trattamento dietetico ad alto contenuto di grassi e zuccheri e poveri in fibre. Studi di metanalisi condotti sul microbiota fecale di pazienti IBS e controlli sani hanno evidenziato una riduzione del genere *Lactobacillus*<sup>164</sup>, questo ha condotto all'ipotesi che questi batteri siano associati all'aumento del peso e deputati alla produzione di D-lattato quando i carboidrati in eccesso non sono assorbiti completamente nel tenue<sup>165</sup>. È interessante notare che valori aumentati di *Lactobacillus* sono stati riscontrati nell'artrite reumatoide e nella malattia di Crohn, correlati a una riduzione di *F. prausnitzii* (in linea con i nostri risultati), associando pertanto l'aumento di tali batteri nel microbiota ad uno stato infiammatorio sistemico.

Le differenze del profilo microbico fecale, condotte su pazienti IBS e CTRL che rispettavano i LARN delle macromolecole alimentari, hanno confermato una maggiore abbondanza di *Prevotella copri* nei pazienti IBS, confermando ulteriormente i nostri risultati. E' stata riscontrata una riduzione di *Roseburia* nei pazienti IBS che hanno un'adeguata assunzione di carboidrati, rispetto ai controlli. Ramsay *et al* hanno dimostrato che *Roseburia spp* è uno dei maggiori produttori di butirrato colico umano<sup>162</sup>, dimostrando l'effetto benefico di tale simbionte sugli enterociti. Infine, è interessante notare l'abbondanza di *Streptococcus anginosus* riscontrata nel

gruppo In-LARN del profilo lipidico dei pazienti IBS, rispetto ai CTRL, definito da Asam *et al* come un potenziale patogeno emergente<sup>166</sup>.

Il meccanismo che regola l'interazione tra pattern di dieta, microbiota intestinale ed ospite non è ancora del tutto chiaro nei pazienti affetti da IBS. Sulla base dei risultati ottenuti, ipotizziamo che una dieta ricca di acidi grassi saturi partecipi all'alterazione della composizione del microbiota intestinale, probabile responsabile non solo di un peggioramento dei sintomi nei pazienti con IBS ma anche dell'innescare o del perpetuarsi del processo infiammatorio a livello intestinale. Certamente ulteriori studi che portino allo sviluppo di metodi più accurati e personalizzati in grado di combinare ed analizzare le caratteristiche del microbiota basale e le caratteristiche cliniche dei pazienti con IBS, sono necessari per meglio comprendere i meccanismi alla base delle alterazioni osservate. Tuttavia, dai dati di questo studio possiamo trarre un'importante conclusione, ovvero che la comprensione delle variazioni dei profili del microbiota o della concentrazione dei metaboliti prodotti dai batteri commensali, potrebbe essere utile a dedurre i meccanismi che contribuiscono alla generazione e all'esacerbazione dei sintomi nei pazienti IBS e potrebbe portare a nuovi sviluppi terapeutici per questa patologia.



## Bibliografia

1. Graziani C., Talocco C., De Sire R., Petit V., Lopetuso LR., Gervasoni J., et al. Intestinal permeability in physiological and pathological conditions: major determinants and assessment modalities. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;**23**(2):795–810. Doi: 10.26355/eurrev\_201901\_16894.
2. Camilleri M., Madsen K., Spiller R., Greenwood-Van Meerveld B., Van Meerveld BG., Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil* 2012;**24**(6):503–12. Doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x.
3. Bischoff SC., Barbara G., Buurman W., Ockhuizen T., Schulzke J-D., Serino M., et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* 2014;**14**. Doi: 10.1186/s12876-014-0189-7.
4. González-Castro AM., Martínez C., Salvo-Romero E., Fortea M., Pardo-Camacho C., Pérez-Berezo T., et al. Mucosal pathobiology and molecular signature of epithelial barrier dysfunction in the small intestine in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2017;**32**(1):53–63. Doi: 10.1111/jgh.13417.
5. Vancamelbeke M., Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;**11**(9):821–34. Doi: 10.1080/17474124.2017.1343143.
6. Farré R. Evaluating the Esophageal Epithelial Integrity: More Complex than it Seems. *Am J Gastroenterol* 2016;**111**(2):295–6. Doi: 10.1038/ajg.2015.408.
7. He L., Yin Y., Li T., Huang R., Xie M., Wu Z., et al. Use of the Ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial tissues. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013;**18**:1266–74. Doi: 10.2741/4178.
8. Whitman WB., Coleman DC., Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**(12):6578–83.
9. Bäckhed F., Ley RE., Sonnenburg JL., Peterson DA., Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;**307**(5717):1915–20. Doi: 10.1126/science.1104816.
10. Lederberg J. Infectious history. *Science* 2000;**288**(5464):287–93.
11. Zoetendal EG., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans ADL., de Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 2002;**68**(7):3401–7.
12. Guarner F., Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;**361**(9356):512–9. Doi: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0.
13. Eckburg PB., Bik EM., Bernstein CN., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;**308**(5728):1635–8. Doi: 10.1126/science.1110591.
14. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende DR., et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;**473**(7346):174–80. Doi: 10.1038/nature09944.
15. Hooper LV., Wong MH., Thelin A., Hansson L., Falk PG., Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001;**291**(5505):881–4. Doi: 10.1126/science.291.5505.881.
16. Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* 2017;**474**(11):1823–36. Doi: 10.1042/BCJ20160510.
17. Scupham AJ., Presley LL., Wei B., Bent E., Griffith N., McPherson M., et al. Abundant and Diverse Fungal Microbiota in the Murine Intestine. *Appl Environ Microbiol* 2006;**72**(1):793–801. Doi: 10.1128/AEM.72.1.793-801.2006.
18. Sokol H., Leducq V., Aschard H., Pham H-P., Jegou S., Landman C., et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 2017;**66**(6):1039–48. Doi: 10.1136/gutjnl-2015-310746.
19. Liguori G., Lamas B., Richard ML., Brandi G., da Costa G., Hoffmann TW., et al. Fungal Dysbiosis in Mucosa-associated Microbiota of Crohn's Disease Patients. *J Crohns Colitis* 2016;**10**(3):296–305. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv209.
20. Zhang T., Breitbart M., Lee WH., Run J-Q., Wei CL., Soh SWL., et al. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol* 2006;**4**(1):e3. Doi: 10.1371/journal.pbio.0040003.
21. Zuo T., Lu X-J., Zhang Y., Cheung CP., Lam S., Zhang F., et al. Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut* 2019;**68**(7):1169–79. Doi: 10.1136/gutjnl-2018-318131.
22. Lepage P., Colombet J., Marteau P., Sime-Ngando T., Doré J., Leclerc M. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* 2008;**57**(3):424–5. Doi: 10.1136/gut.2007.134668.

23. Zuo T., Kamm MA., Colombel J-F., Ng SC. Urbanization and the gut microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;**15**(7):440–52. Doi: 10.1038/s41575-018-0003-z.
24. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977;**31**:107–33. Doi: 10.1146/annurev.mi.31.100177.000543.
25. Sender R., Fuchs S., Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 2016;**14**(8). Doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
26. Jandhyala SM., Talukdar R., Subramanyam C., Vuyyuru H., Sasikala M., Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015;**21**(29):8787–803. Doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.
27. Sekirov I., Russell SL., Antunes LCM., Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010;**90**(3):859–904. Doi: 10.1152/physrev.00045.2009.
28. Tattoli I., Petitta C., Scirocco A., Ammoscato F., Cicienia A., Severi C. Microbiota, innate immune system, and gastrointestinal muscle: ongoing studies. *J Clin Gastroenterol* 2012;**46** Suppl:S6-11. Doi: 10.1097/MCG.0b013e318265ea7d.
29. Morgan XC., Segata N., Huttenhower C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet* 2013;**29**(1):51–8. Doi: 10.1016/j.tig.2012.09.005.
30. Morgan XC., Huttenhower C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Comput Biol* 2012;**8**(12):e1002808. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1002808.
31. Chey WD., Kurlander J., Eswaran S. Irritable bowel syndrome: a clinical review. *JAMA* 2015;**313**(9):949–58. Doi: 10.1001/jama.2015.0954.
32. Ford AC., Lacy BE., Talley NJ. Irritable Bowel Syndrome. *N Engl J Med* 2017;**376**(26):2566–78. Doi: 10.1056/NEJMra1607547.
33. American College of Gastroenterology Functional Gastrointestinal Disorders Task Force Evidence-based position statement on the management of irritable bowel syndrome in North America. *Am J Gastroenterol* 2002;**97**(11 Suppl):S1-5. Doi: 10.1016/s0002-9270(02)05656-3.
34. Unigastro. *Manuale di gastroenterologia. Unigastro 2013-2015*. Il Pensiero Scientifico; 2013.
35. Kanazawa M., Hongo M., Fukudo S. Visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;**26** Suppl 3:119–21. Doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06640.x.
36. Hadjivasilis A., Tsioutis C., Michalinos A., Ntourakis D., Christodoulou DK., Agouridis AP. New insights into irritable bowel syndrome: from pathophysiology to treatment. *Ann Gastroenterol* 2019;**32**(6):554–64. Doi: 10.20524/aog.2019.0428.
37. Barbara G., Cremon C., Carini G., Bellacosa L., Zecchi L., De Giorgio R., et al. The immune system in irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil* 2011;**17**(4):349–59. Doi: 10.5056/jnm.2011.17.4.349.
38. Bhattarai Y., Muniz Pedrego DA., Kashyap PC. Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017;**312**(1):G52–62. Doi: 10.1152/ajpgi.00338.2016.
39. Simrén M., Barbara G., Flint HJ., Spiegel BMR., Spiller RC., Vanner S., et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013;**62**(1):159–76. Doi: 10.1136/gutjnl-2012-302167.
40. Crouzet L., Gaultier E., Del’Homme C., Cartier C., Delmas E., Dapoigny M., et al. The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol Motil* 2013;**25**(4):e272-282. Doi: 10.1111/nmo.12103.
41. Zoetendal EG., Rajilic-Stojanovic M., de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 2008;**57**(11):1605–15. Doi: 10.1136/gut.2007.133603.
42. Jeffery IB., O’Toole PW., Öhman L., Claesson MJ., Deane J., Quigley EMM., et al. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 2012;**61**(7):997–1006. Doi: 10.1136/gutjnl-2011-301501.
43. Maharshak N., Ringel Y., Katibian D., Lundqvist A., Sartor RB., Carroll IM., et al. Fecal and Mucosa-Associated Intestinal Microbiota in Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Dig Dis Sci* 2018;**63**(7):1890–9. Doi: 10.1007/s10620-018-5086-4.
44. Moayyedi P., Mearin F., Azpiroz F., Andresen V., Barbara G., Corsetti M., et al. Irritable bowel syndrome diagnosis and management: A simplified algorithm for clinical practice. *United European Gastroenterol J* 2017;**5**(6):773–88. Doi: 10.1177/2050640617731968.
45. Gibson PR., Varney J., Malakar S., Muir JG. Food components and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2015;**148**(6):1158-1174.e4. Doi: 10.1053/j.gastro.2015.02.005.

46. Hayes PA., Fraher MH., Quigley EMM. Irritable bowel syndrome: the role of food in pathogenesis and management. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2014;**10**(3):164–74.
47. Farré R., Tack J. Food and symptom generation in functional gastrointestinal disorders: physiological aspects. *Am J Gastroenterol* 2013;**108**(5):698–706. Doi: 10.1038/ajg.2013.24.
48. Mazzawi T., Hausken T., Gundersen D., El-Salhy M. Effect of dietary management on the gastric endocrine cells in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Clin Nutr* 2015;**69**(4):519–24. Doi: 10.1038/ejcn.2014.151.
49. McKenzie YA., Bowyer RK., Leach H., Gulia P., Horobin J., O'Sullivan NA., et al. British Dietetic Association systematic review and evidence-based practice guidelines for the dietary management of irritable bowel syndrome in adults (2016 update). *J Hum Nutr Diet* 2016;**29**(5):549–75. Doi: 10.1111/jhn.12385.
50. Simrén M., Månsson A., Langkilde AM., Svedlund J., Abrahamsson H., Bengtsson U., et al. Food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome. *Digestion* 2001;**63**(2):108–15. Doi: 10.1159/000051878.
51. Mushref MA., Srinivasan S. Effect of high fat-diet and obesity on gastrointestinal motility. *Ann Transl Med* 2013;**1**(2):14. Doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2012.11.01.
52. Rinninella E., Cintoni M., Mele MC., Gasbarrini A. Irritable Bowel Syndrome (IBS) and Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): Where Is the Culprit Hiding? Nutritional Tips for Gastroenterologists. *Nutrients* 2019;**11**(10). Doi: 10.3390/nu11102499.
53. Bonfrate L., Tack J., Grattagliano I., Cuomo R., Portincasa P. Microbiota in health and irritable bowel syndrome: current knowledge, perspectives and therapeutic options. *Scand J Gastroenterol* 2013;**48**(9):995–1009. Doi: 10.3109/00365521.2013.799220.
54. Clarke SF., Murphy EF., O'Sullivan O., Lucey AJ., Humphreys M., Hogan A., et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 2014;**63**(12):1913–20. Doi: 10.1136/gutjnl-2013-306541.
55. Halmos EP., Power VA., Shepherd SJ., Gibson PR., Muir JG. A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2014;**146**(1):67-75.e5. Doi: 10.1053/j.gastro.2013.09.046.
56. Staudacher HM., Whelan K. Altered gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome and its modification by diet: probiotics, prebiotics and the low FODMAP diet. *Proc Nutr Soc* 2016;**75**(3):306–18. Doi: 10.1017/S0029665116000021.
57. Nanayakkara WS., Skidmore PM., O'Brien L., Wilkinson TJ., Gearry RB. Efficacy of the low FODMAP diet for treating irritable bowel syndrome: the evidence to date. *Clin Exp Gastroenterol* 2016;**9**:131–42. Doi: 10.2147/CEG.S86798.
58. Manuale di aggiornamento sulle malattie infiammatorie croniche intestinali MICI / a cura di S. Gullini, D. Cantarini.
59. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;**12**(4):205–17. Doi: 10.1038/nrgastro.2015.34.
60. Molodecky NA., Soon IS., Rabi DM., Ghali WA., Ferris M., Chernoff G., et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;**142**(1):46-54.e42; quiz e30. Doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.001.
61. Longo D., Fauci A., Kasper D., Hauser S., Jameson J., Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition*. McGraw Hill Professional; 2011.
62. Tamboli CP., Neut C., Desreumaux P., Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;**53**(1):1–4.
63. Lepage P., Colombet J., Marteau P., Sime-Ngando T., Doré J., Leclerc M. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* 2008;**57**(3):424–5. Doi: 10.1136/gut.2007.134668.
64. Merwe JPV de., Schröder AM., Wensinck F., Hazenberg MP. The Obligate Anaerobic Faecal Flora of Patients with Crohn's Disease and Their First-Degree Relatives. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1988;**23**(9):1125–31. Doi: 10.3109/00365528809090179.
65. Knights D., Silverberg MS., Weersma RK., Gevers D., Dijkstra G., Huang H., et al. Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med* 2014;**6**(12):107. Doi: 10.1186/s13073-014-0107-1.
66. Simpson HL., Campbell BJ., Rhodes JM. IBD: microbiota manipulation through diet and modified bacteria. *Dig Dis* 2014;**32 Suppl 1**:18–25. Doi: 10.1159/000367821.

67. Ferguson LR. Nutrigenetics, nutrigenomics and inflammatory bowel diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;**9**(8):717–26. Doi: 10.1586/1744666X.2013.824245.
68. Levine A., Wine E. Effects of enteral nutrition on Crohn's disease: clues to the impact of diet on disease pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 2013;**19**(6):1322–9. Doi: 10.1097/MIB.0b013e3182802acc.
69. Hansen JJ., Sartor RB. Therapeutic Manipulation of the Microbiome in IBD: Current Results and Future Approaches. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2015;**13**(1):105–20. Doi: 10.1007/s11938-014-0042-7.
70. Walker AW., Sanderson JD., Churcher C., Parkes GC., Hudspith BN., Rayment N., et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 2011;**11**:7. Doi: 10.1186/1471-2180-11-7.
71. Sokol H., Seksik P., Furet JP., Firmesse O., Nion-Larmurier I., Beaugerie L., et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**(8):1183–9. Doi: 10.1002/ibd.20903.
72. Joossens M., Huys G., Cnockaert M., De Preter V., Verbeke K., Rutgeerts P., et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 2011;**60**(5):631–7. Doi: 10.1136/gut.2010.223263.
73. Serban DE. Microbiota in Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis and Therapy: Is It All About Diet? *Nutr Clin Pract* 2015;**30**(6):760–79. Doi: 10.1177/0884533615606898.
74. Cao Y., Shen J., Ran ZH. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. *Gastroenterol Res Pract* 2014;**2014**. Doi: 10.1155/2014/872725.
75. Wyatt J., Oberhuber G., Pongratz S., Püspök A., Moser G., Novacek G., et al. Increased gastric and intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1997;**92**(10):1891–6.
76. Shawki A., McCole DF. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017;**3**(1):41–50. Doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.10.004.
77. Antoni L., Nuding S., Wehkamp J., Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014;**20**(5):1165–79. Doi: 10.3748/wjg.v20.i5.1165.
78. Yan F., Cao H., Cover TL., Washington MK., Shi Y., Liu L., et al. Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2011;**121**(6):2242–53. Doi: 10.1172/JCI44031.
79. Maaser C., Sturm A., Vavricka SR., Kucharzik T., Fiorino G., Annese V., et al. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J Crohns Colitis* 2019;**13**(2):144–64. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjy113.
80. Bull MJ., Plummer NT. Part 2: Treatments for Chronic Gastrointestinal Disease and Gut Dysbiosis. *Integr Med (Encinitas)* 2015;**14**(1):25–33.
81. Gomollón F., Dignass A., Annese V., Tilg H., Van Assche G., Lindsay JO., et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* 2017;**11**(1):3–25. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw168.
82. Magro F., Gionchetti P., Eliakim R., Ardizzone S., Armuzzi A., Barreiro-de Acosta M., et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis* 2017;**11**(6):649–70. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx008.
83. Harbord M., Annese V., Vavricka SR., Allez M., Barreiro-de Acosta M., Boberg KM., et al. The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* 2016;**10**(3):239–54. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv213.
84. Konikoff MR., Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;**12**(6):524–34. Doi: 10.1097/00054725-200606000-00013.
85. Sturm A., Maaser C., Calabrese E., Annese V., Fiorino G., Kucharzik T., et al. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 2: IBD scores and general principles and technical aspects. *J Crohns Colitis* 2019;**13**(3):273–84. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjy114.
86. Bryant RV., Sandborn WJ., Travis SPL. Introducing vedolizumab to clinical practice: who, when, and how? *J Crohns Colitis* 2015;**9**(4):356–66. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv033.
87. Feagan BG., Rutgeerts P., Sands BE., Hanauer S., Colombel J-F., Sandborn WJ., et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2013;**369**(8):699–710. Doi: 10.1056/NEJMoa1215734.

88. Sandborn WJ., Feagan BG., Rutgeerts P., Hanauer S., Colombel J-F., Sands BE., et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2013;**369**(8):711–21. Doi: 10.1056/NEJMoa1215739.
89. Sands BE., Feagan BG., Rutgeerts P., Colombel J-F., Sandborn WJ., Sy R., et al. Effects of vedolizumab induction therapy for patients with Crohn's disease in whom tumor necrosis factor antagonist treatment failed. *Gastroenterology* 2014;**147**(3):618–627.e3. Doi: 10.1053/j.gastro.2014.05.008.
90. Cho I., Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012;**13**(4):260–70. Doi: 10.1038/nrg3182.
91. Nishida A., Inoue R., Inatomi O., Bamba S., Naito Y., Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol* 2018;**11**(1):1–10. Doi: 10.1007/s12328-017-0813-5.
92. Xavier RJ., Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;**448**(7152):427–34. Doi: 10.1038/nature06005.
93. Kamada N., Kao JY. The tuning of the gut nervous system by commensal microbiota. *Gastroenterology* 2013;**145**(6):1193–6.
94. Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnaud E., Gloux K., Pelletier E., Frangeul L., et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;**55**(2):205–11. Doi: 10.1136/gut.2005.073817.
95. Willing BP., Dicksved J., Halfvarson J., Andersson AF., Lucio M., Zheng Z., et al. A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease Phenotypes. *Gastroenterology* 2010;**139**(6):1844–1854.e1. Doi: 10.1053/j.gastro.2010.08.049.
96. Spiller R., Lam C. An Update on Post-infectious Irritable Bowel Syndrome: Role of Genetics, Immune Activation, Serotonin and Altered Microbiome. *J Neurogastroenterol Motil* 2012;**18**(3):258–68. Doi: 10.5056/jnm.2012.18.3.258.
97. Sundin J., Rangel I., Repsilber D., Brummer R-J. Cytokine Response after Stimulation with Key Commensal Bacteria Differ in Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome (PI-IBS) Patients Compared to Healthy Controls. *PLoS ONE* 2015;**10**(9):e0134836. Doi: 10.1371/journal.pone.0134836.
98. Ercolini D., De Filippis F., La Storia A., Iacono M. "Remake" by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**(22):8142–5. Doi: 10.1128/AEM.02218-12.
99. Caporaso JG., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman FD., Costello EK., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;**7**(5):335–6. Doi: 10.1038/nmeth.f.303.
100. Segata N., Izard J., Waldron L., Gevers D., Miropolsky L., Garrett WS., et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011;**12**(6):R60. Doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
101. Hiippala K., Kainulainen V., Kalliomäki M., Arkkila P., Satokari R. Mucosal Prevalence and Interactions with the Epithelium Indicate Commensalism of *Sutterella* spp. *Front Microbiol* 2016;**7**:1706. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01706.
102. Botschuijver S., Roeselers G., Levin E., Jonkers DM., Welting O., Heinsbroek SEM., et al. Intestinal Fungal Dysbiosis Is Associated With Visceral Hypersensitivity in Patients With Irritable Bowel Syndrome and Rats. *Gastroenterology* 2017;**153**(4):1026–39. Doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.004.
103. Altomare A., Putignani L., Del Chierico F., Cocca S., Angeletti S., Ciccozzi M., et al. Gut mucosal-associated microbiota better discloses inflammatory bowel disease differential patterns than faecal microbiota. *Dig Liver Dis* 2019;**51**(5):648–56. Doi: 10.1016/j.dld.2018.11.021.
104. Vasquez N., Mangin I., Lepage P., Seksik P., Duong J-P., Blum S., et al. Patchy distribution of mucosal lesions in ileal Crohn's disease is not linked to differences in the dominant mucosa-associated bacteria: a study using fluorescence in situ hybridization and temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;**13**(6):684–92. Doi: 10.1002/ibd.20084.
105. Bibiloni R., Mangold M., Madsen KL., Fedorak RN., Tannock GW. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol* 2006;**55**(Pt 8):1141–9. Doi: 10.1099/jmm.0.46498-0.
106. Sokol H., Lepage P., Seksik P., Doré J., Marteau P. Molecular comparison of dominant microbiota associated with injured versus healthy mucosa in ulcerative colitis. *Gut* 2007;**56**(1):152–4. Doi: 10.1136/gut.2006.109686.
107. Seksik P., Lepage P., de la Cochetière M-F., Bourreille A., Sutren M., Galmiche J-P., et al. Search for localized dysbiosis in Crohn's disease ulcerations by temporal temperature gradient gel

- electrophoresis of 16S rRNA. *J Clin Microbiol* 2005;**43**(9):4654–8. Doi: 10.1128/JCM.43.9.4654-4658.2005.
108. Gophna U., Konikoff T., Nielsen HB. Oscillospira and related bacteria - From metagenomic species to metabolic features. *Environ Microbiol* 2017;**19**(3):835–41. Doi: 10.1111/1462-2920.13658.
109. Derrien M., Belzer C., de Vos WM. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microb Pathog* 2017;**106**:171–81. Doi: 10.1016/j.micpath.2016.02.005.
110. Everard A., Belzer C., Geurts L., Ouwerkerk JP., Druart C., Bindels LB., et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;**110**(22):9066–71. Doi: 10.1073/pnas.1219451110.
111. Png CW., Lindén SK., Gilshenan KS., Zoetendal EG., McSweeney CS., Sly LI., et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 2010;**105**(11):2420–8. Doi: 10.1038/ajg.2010.281.
112. Rajilić-Stojanović M., Shanahan F., Guarner F., de Vos WM. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm Bowel Dis* 2013;**19**(3):481–8. Doi: 10.1097/MIB.0b013e31827fec6d.
113. Gobert AP., Sagrestani G., Delmas E., Wilson KT., Verriere TG., Dapoigny M., et al. The human intestinal microbiota of constipated-predominant irritable bowel syndrome patients exhibits anti-inflammatory properties. *Sci Rep* 2016;**6**:39399. Doi: 10.1038/srep39399.
114. Kasai C., Sugimoto K., Moritani I., Tanaka J., Oya Y., Inoue H., et al. Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: Terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing analyses. *Oncol Rep* 2016;**35**(1):325–33. Doi: 10.3892/or.2015.4398.
115. Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis - PubMed. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.01202>. Accessed August 6, 2020.
116. Creely SJ., McTernan PG., Kusminski CM., Fisher FF M., Da Silva NF., Khanolkar M., et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;**292**(3):E740-747. Doi: 10.1152/ajpendo.00302.2006.
117. Pedersen HK., Gudmundsdottir V., Nielsen HB., Hyotylainen T., Nielsen T., Jensen BAH., et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 2016;**535**(7612):376–81. Doi: 10.1038/nature18646.
118. Rooks MG., Veiga P., Wardwell-Scott LH., Tickle T., Segata N., Michaud M., et al. Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. *ISME J* 2014;**8**(7):1403–17. Doi: 10.1038/ismej.2014.3.
119. Herrera P., Kwon YM., Ricke SC. Ecology and pathogenicity of gastrointestinal Streptococcus bovis. *Anaerobe* 2009;**15**(1–2):44–54. Doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.11.003.
120. Palmela C., Chevarin C., Xu Z., Torres J., Sevrin G., Hirten R., et al. Adherent-invasive Escherichia coli in inflammatory bowel disease. *Gut* 2018;**67**(3):574–87. Doi: 10.1136/gutjnl-2017-314903.
121. Gophna U., Sommerfeld K., Gophna S., Doolittle WF., Veldhuyzen van Zanten SJO. Differences between tissue-associated intestinal microbiotas of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2006;**44**(11):4136–41. Doi: 10.1128/JCM.01004-06.
122. Baumgart M., Dogan B., Rishniw M., Weitzman G., Bosworth B., Yantiss R., et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive Escherichia coli of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J* 2007;**1**(5):403–18. Doi: 10.1038/ismej.2007.52.
123. Jensen SR., Mirsepasi-Lauridsen HC., Thysen AH., Brynskov J., Krogfelt KA., Petersen AM., et al. Distinct inflammatory and cytopathic characteristics of Escherichia coli isolates from inflammatory bowel disease patients. *Int J Med Microbiol* 2015;**305**(8):925–36. Doi: 10.1016/j.ijmm.2015.10.002.
124. Lozupone CA., Stombaugh JL., Gordon JL., Jansson JK., Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;**489**(7415):220–30. Doi: 10.1038/nature11550.
125. den Besten G., van Eunen K., Groen AK., Venema K., Reijngoud D-J., Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 2013;**54**(9):2325–40. Doi: 10.1194/jlr.R036012.
126. Unno T., Choi J-H., Hur H-G., Sadowsky MJ., Ahn Y-T., Huh C-S., et al. Changes in human gut microbiota influenced by probiotic fermented milk ingestion. *J Dairy Sci* 2015;**98**(6):3568–76. Doi: 10.3168/jds.2014-8943.



127. Wang Y., Gao X., Ghazlane A., Hu H., Li X., Xiao Y., et al. Characteristics of Faecal Microbiota in Paediatric Crohn's Disease and Their Dynamic Changes During Infliximab Therapy. *J Crohns Colitis* 2018;**12**(3):337–46. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx153.
128. Duboc H., Rajca S., Rainteau D., Benarous D., Maubert M-A., Quervain E., et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2013;**62**(4):531–9. Doi: 10.1136/gutjnl-2012-302578.
129. Islam KBMS., Fukiya S., Hagio M., Fujii N., Ishizuka S., Ooka T., et al. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology* 2011;**141**(5):1773–81. Doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.046.
130. Duboc H., Rainteau D., Rajca S., Humbert L., Farabos D., Maubert M., et al. Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2012;**24**(6):513–20, e246–247. Doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01893.x.
131. Aries V., Crowther JS., Drasar BS., Hill MJ. Degradation of bile salts by human intestinal bacteria. *Gut* 1969;**10**(7):575–6. Doi: 10.1136/gut.10.7.575.
132. Dior M., Delagrèverie H., Duboc H., Jouet P., Coffin B., Brot L., et al. Interplay between bile acid metabolism and microbiota in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2016;**28**(9):1330–40. Doi: 10.1111/nmo.12829.
133. Nell S., Suerbaum S., Josenhans C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**(8):564–77. Doi: 10.1038/nrmicro2403.
134. Frank DN., Robertson CE., Hamm CM., Kpadeh Z., Zhang T., Chen H., et al. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**(1):179–84. Doi: 10.1002/ibd.21339.
135. Nagao-Kitamoto H., Kitamoto S., Kuffa P., Kamada N. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. *Intest Res* 2016;**14**(2):127–38. Doi: 10.5217/ir.2016.14.2.127.
136. Zeissig S., Bürgel N., Günzel D., Richter J., Mankertz J., Wahnschaffe U., et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007;**56**(1):61–72. Doi: 10.1136/gut.2006.094375.
137. Sanderson IR., Boulton P., Menzies I., Walker-Smith JA. Improvement of abnormal lactulose/rhamnose permeability in active Crohn's disease of the small bowel by an elemental diet. *Gut* 1987;**28**(9):1073–6.
138. Teshima CW., Dieleman LA., Meddings JB. Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2012;**1258**:159–65. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06612.x.
139. Wallon C., Braaf Y., Wolving M., Olaison G., Söderholm JD. Endoscopic biopsies in Ussing chambers evaluated for studies of macromolecular permeability in the human colon. *Scand J Gastroenterol* 2005;**40**(5):586–95. Doi: 10.1080/00365520510012235.
140. Wang F., Graham WV., Wang Y., Witkowski ED., Schwarz BT., Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 2005;**166**(2):409–19. Doi: 10.1016/s0002-9440(10)62264-x.
141. Noth R., Stüber E., Häslér R., Nikolaus S., Kühbacher T., Hampe J., et al. Anti-TNF- $\alpha$  antibodies improve intestinal barrier function in Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2012;**6**(4):464–9. Doi: 10.1016/j.crohns.2011.10.004.
142. Suenaert P., Bulteel V., Lemmens L., Noman M., Geypens B., Van Assche G., et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;**97**(8):2000–4. Doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05914.x.
143. Suenaert P., Bulteel V., Vermeire S., Noman M., Van Assche G., Rutgeerts P. Hyperresponsiveness of the mucosal barrier in Crohn's disease is not tumor necrosis factor-dependent. *Inflamm Bowel Dis* 2005;**11**(7):667–73. Doi: 10.1097/01.mib.0000168371.87283.4b.
144. Vogelsang H. Do changes in intestinal permeability predict disease relapse in Crohn's disease? *Inflamm Bowel Dis* 2008;**14 Suppl 2**:S162–163. Doi: 10.1002/ibd.20617.
145. Irvine EJ., Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 2000;**119**(6):1740–4. Doi: 10.1053/gast.2000.20231.
146. Michielan A., D'Incà R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm* 2015;**2015**:628157. Doi: 10.1155/2015/628157.

147. Keita ÅV., Lindqvist CM., Öst Å., Magana CDL., Schoultz I., Halfvarson J. Gut Barrier Dysfunction-A Primary Defect in Twins with Crohn's Disease Predominantly Caused by Genetic Predisposition. *J Crohns Colitis* 2018;**12**(10):1200–9. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjy045.
148. Schmitz H., Barmeyer C., Fromm M., Runkel N., Foss HD., Bentzel CJ., et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999;**116**(2):301–9.
149. Piche T., Barbara G., Aubert P., Bruley des Varannes S., Dainese R., Nano JL., et al. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009;**58**(2):196–201. Doi: 10.1136/gut.2007.140806.
150. Varvaynets AV., Chopei IV., Chubirko KI. [Clinical and endoscopic efficacy of vedolizumab in patients with ulcerative colitis]. *Wiad Lek* 2018;**71**(2 pt 1):346–9.
151. Wild GE., Waschke KA., Bitton A., Thomson ABR. The mechanisms of prednisone inhibition of inflammation in Crohn's disease involve changes in intestinal permeability, mucosal TNFalpha production and nuclear factor kappa B expression. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;**18**(3):309–17. Doi: 10.1046/j.1365-2036.2003.01611.x.
152. Miki K., Moore DJ., Butler RN., Southcott E., Couper RT., Davidson GP. The sugar permeability test reflects disease activity in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J Pediatr* 1998;**133**(6):750–4. Doi: 10.1016/s0022-3476(98)70145-3.
153. Yakymenko O., Schoultz I., Gullberg E., Ström M., Almer S., Wallon C., et al. Infliximab restores colonic barrier to adherent-invasive E. coli in Crohn's disease via effects on epithelial lipid rafts. *Scand J Gastroenterol* 2018;**53**(6):677–84. Doi: 10.1080/00365521.2018.1458146.
154. Vivinus-Nébot M., Frin-Mathy G., Bziouche H., Dainese R., Bernard G., Anty R., et al. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut* 2014;**63**(5):744–52. Doi: 10.1136/gutjnl-2012-304066.
155. David LA., Maurice CF., Carmody RN., Gootenberg DB., Button JE., Wolfe BE., et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;**505**(7484):559–63. Doi: 10.1038/nature12820.
156. Monteagudo C., Mariscal-Arcas M., Rivas A., Lorenzo-Tovar ML., Tur JA., Olea-Serrano F. Proposal of a Mediterranean Diet Serving Score. *PLoS ONE* 2015;**10**(6):e0128594. Doi: 10.1371/journal.pone.0128594.
157. Wu GD., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y-Y., Keilbaugh SA., et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* 2011;**334**(6052):105–8. Doi: 10.1126/science.1208344.
158. Etxeberria U., Arias N., Boqué N., Macarulla MT., Portillo MP., Milagro FI., et al. Shifts in microbiota species and fermentation products in a dietary model enriched in fat and sucrose. *Benef Microbes* 2015;**6**(1):97–111. Doi: 10.3920/BM2013.0097.
159. Gérard P. Gut microbiota and obesity. *Cell Mol Life Sci* 2016;**73**(1):147–62. Doi: 10.1007/s00018-015-2061-5.
160. Zito FP., Polese B., Vozzella L., Gala A., Genovese D., Verlezza V., et al. Good adherence to mediterranean diet can prevent gastrointestinal symptoms: A survey from Southern Italy. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2016;**7**(4):564–71. Doi: 10.4292/wjgpt.v7.i4.564.
161. Feinle-Bisset C., Azpiroz F. Dietary and lifestyle factors in functional dyspepsia. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;**10**(3):150–7. Doi: 10.1038/nrgastro.2012.246.
162. Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijs I., Eeckhaut V., et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2014;**63**(8):1275–83. Doi: 10.1136/gutjnl-2013-304833.
163. Sokol H., Seksik P., Furet JP., Firmesse O., Nion-Larmurier I., Beaugerie L., et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**(8):1183–9. Doi: 10.1002/ibd.20903.
164. Zhang M., Qiu X., Zhang H., Yang X., Hong N., Yang Y., et al. *Faecalibacterium prausnitzii* inhibits interleukin-17 to ameliorate colorectal colitis in rats. *PLoS ONE* 2014;**9**(10):e109146. Doi: 10.1371/journal.pone.0109146.
165. Le Roy CI., Štšepetova J., Sepp E., Songisepp E., Claus SP., Mikelsaar M. New insights into the impact of *Lactobacillus* population on host-bacteria metabolic interplay. *Oncotarget* 2015;**6**(31):30545–56. Doi: 10.18632/oncotarget.5906.

Tesi di dottorato in Bioingegneria e bioscienze, di Silvia Cocca,  
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 01/12/2020.  
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,  
a condizione che ne venga citata la fonte.

166. Asam D., Spellerberg B. Molecular pathogenicity of *Streptococcus anginosus*. *Mol Oral Microbiol* 2014;**29**(4):145–55. Doi: 10.1111/omi.12056.

## PRODUZIONE SCIENTIFICA a.a. 2017-2020

1. Pauwels A., Broers C., Vanuytsel T., Pardon N., **Cocca S**, Roman S, Zerbib F., Tack J., Farré R. A reduced oesophageal epithelial integrity in a subgroup of healthy subjects increases with proton pump inhibitor therapy. *UEG journal*, December 2017.
2. Altomare A, Putignani L, Del Chierico F, **Cocca S**, Angeletti S, Ciccozzi M, Tripiciano C, Dalla Piccola B, Cicala M, Guarino MPL. Gut mucosal-associated microbiota better discloses inflammatory bowel disease differential patterns than faecal microbiota. *Dig Liver Dis* 2019 May;51(5):648-656. doi: 10.1016/j.dld.2018.11.021. Epub 2018 Dec 3.
3. **S. Cocca**, Lucio Sarpi Diverticolo peri-ampollare: un accesso biliare difficile?“, *Case report* pubblicazione sul *Giornale Italiano di Endoscopia Digestiva* n.4/2019 Dicembre.
4. A. Lo Presti, F. Zorzi, F. Del Chierico, A. Altomare, **S. Cocca**, A. Avola, et al. Fecal and Mucosal Microbiota Profiling in Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol* 2019 Jul 17;10:1655. doi: 10.3389/fmicb.2019.01655.
5. S. Mangiafico, Pigò F., Russo S., **Cocca S.**, Grande G., Conigliaro R. Cosa fare endoscopicamente in caso di sanguinamento digestivo refrattario alla terapia convenzionale. Pubblicazione sul *Giornale Italiano di Endoscopia Digestiva* n.1/2020.
6. M. Gori, A. Altomare, **S. Cocca**, E. Solida, M. Ribolsi, S. Carotti, A. Rainer, M. Francesconi, S. Morini, M. Cicala, M.P.L. Guarino. Palmitic Acid Affects Intestinal Epithelial Barrier Integrity and Permeability In Vitro. *Antioxidants (Basel)* 2020 May 13;9(5):417. doi: 10.3390/antiox9050417.
7. A. Altomare, M. Gori, **S. Cocca**, S. Carotti, M. Francesconi, M. Ribolsi, S. Emerenziani, S. Morini, M. Cicala, MPG Guarino. Impaired colonic contractility and intestinal permeability in symptomatic uncomplicated diverticular disease. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. UNDER REVIEW
8. A. Altomare, F. Del Chierico, G. Rocchi, S. Emerenziani, M. Ciccozzi, C. Nuglio, A. Lo Presti, **S. Cocca**, M. Ribolsi, L. Putignani, M. Muscaritoli, M. Cicala, MPG Guarino. Correlation between dietary habits and fecal microbiota composition in irritable bowel syndrome patients. *Clinical Nutrition*. UNDER REVIEW
9. S. Cocca, G. Grande, L. Reggiani Bonetti, P. Magistri, S. Di Sandro, F. Di Benedetto, R. Conigliaro and H. Bertani. Common bile duct lesions: how cholangioscopy could help rule out an intraductal papillary neoplasm of the bile duct. *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy* - ahead of print.
10. G. Grande, S. Cocca, S. Russo, S. Mangiafico, A. Caruso, F. Pigò, R. Conigliaro, H. Bertani. COVID-19 and the Gastrointestinal System: Lesions Beyond the Symptoms? *ACG Case Rep J* 2020 Sep 24;7(9):e00464. doi: 10.14309/crj.0000000000000464. eCollection 2020 Sep.
11. H. Vanheel, M. Vicario, D. Beeckmans, S. Cocca, L. Wauters, A. Accarie, J. Toth, H. Rodewald, G. Matteoli, G. Boeckxstaens, J. Tack, R. Farré, T. Vanuytsel. Duodenal acidification induces gastric relaxation and alters epithelial barrier function by a mast cell independent mechanism. *Scientific reports* – ahead of print.