



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Medicina e Psicologia

Dipartimento di Scienze Medico-Chirurgiche e di Medicina Traslazionale

DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA (XXIX CICLO)

Curriculum Oncologia Digestiva

Sviluppo di un modello “*ex vivo organ culture*” per la valutazione del microbiota intestinale: applicazioni in Oncologia Digestiva

Dottorando

Dott. Claudio Lanini

Coordinatore

Prof. Giovanni Ramacciato

Relatore

Dott. Cristiano Pagnini

Coordinatore Curriculum

Prof. Gianfranco Delle Fave

Anno Accademico 2015-2016

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Il microbiota intestinale	1
1.1.1. Definizione	1
1.1.2. Composizione e localizzazione	2
1.1.3. Sviluppo e modificazioni: il microbiota nel neonato e nell'adulto	3
1.1.4. Funzioni	4
1.2. Probiotici e prebiotici	5
1.2.1. Probiotici: definizione e funzioni	5
1.2.2. Prebiotici: definizione e funzioni	7
1.3. Cancerogenesi della mucosa colica	8
1.3.1. Polipi intestinali	8
1.3.1.1. <i>Definizione e caratteristiche</i>	8
1.3.1.2. <i>Polipi non-neoplastici</i>	8
1.3.1.3. <i>Polipi neoplastici o adenomi</i>	9
1.3.2. Carcinoma colo-rettale	10
1.3.2.1. <i>Epidemiologia e prognosi</i>	10
1.3.2.2. <i>Eziologia e fattori di rischio</i>	10
1.3.2.3. <i>Storia naturale e alterazioni molecolari</i>	11
1.4. Relazione tra microbiota e tumore del colon retto	13
1.4.1. Ruolo pro-carcinogenetico del microbiota	14
1.4.1.1. <i>Microbiota ed infiammazione</i>	14
1.4.1.2. <i>Microbiota e attivazione dei pro-carcinogeni</i>	15
1.4.2. Ruolo anti-carcinogenetico del microbiota	16

1.4.3. Modifiche a livello dell'ospite	18
1.5. Metodi di studio del microbiota	19
1.5.1. Metodi classici	20
<i>1.5.1.1. Colture in batch</i>	20
<i>1.5.1.2. Colture continue</i>	21
<i>1.5.1.3. Modelli animali</i>	21
1.5.2. Metodi basati sul sequenziamento	22
<i>1.5.2.1. Sequenziamento dell'RNA ribosomiale</i>	22
<i>1.5.2.2. Sequenziamento completo del genoma</i>	23
<i>1.5.2.3. Metagenomica</i>	24
<i>1.5.2.4. Sequenziamento da singola cellula</i>	25
<i>1.5.2.5. Metatrascrittomica</i>	26
1.5.3. Metodi molecolari	26
<i>1.5.3.1. DNA fingerprinting</i>	26
<i>1.5.3.2. DNA microarray</i>	27
1.5.4. Metodi quantitativi	28
<i>1.5.4.1. PCR quantitativa (o Real-time PCR)</i>	28
<i>1.5.4.2. Ibridazione fluorescente in situ (FISH)</i>	29
1.5.5. Metodi funzionali	29
<i>1.5.5.1. Metaproteomica</i>	29
<i>1.5.5.2. Metabolomica</i>	30
<i>1.5.5.3. Marcatura con isotopi stabili</i>	31
2. Scopo della tesi	32
3. Materiali e metodi	33
3.1. Pazienti	33

3.2. Campioni biotici: il modello sperimentale <i>ex vivo</i>	33
3.3. Estrazione del DNA/RNA	34
3.4. Real-time PCR	35
3.5. Statistica	35
4. Risultati e conclusioni	36
4.1. Risultati	36
4.2. Conclusioni	43
5. Bibliografia	45

1. Introduzione

Da molti anni è noto il ruolo che la microflora batterica intestinale o microbiota, svolge nel mantenimento dell'omeostasi dell'organismo umano, ma solo recentemente, tramite l'utilizzo di tecniche colturali e di biologia molecolare sempre più efficienti, si sono avuti progressi notevoli nello studio della microflora endogena.

L'interesse della comunità scientifica è stato focalizzato sulle interazioni tra microbiota intestinale e ospite¹, con particolare riguardo alle condizioni fisiologiche e/o patologiche che possono causare un'alterazione della composizione e del numero dei microrganismi presenti nell'intestino umano. D'altro canto, numerosi studi hanno già proposto l'utilizzo di batteri provvisti di effetti benefici sulla salute dell'uomo o probiotici, nel trattamento di alcune condizioni patologiche, quali la diarrea infettiva, la sindrome dell'intestino irritabile (IBS) e le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD).

A tal proposito, assume una notevole importanza l'approfondimento degli studi sul ruolo del microbiota intestinale nella cancerogenesi della mucosa del colon, dalla formazione dei polipi adenomatosi fino a quella del carcinoma colon-rettale, allo scopo di ridurre l'insorgenza e/o l'incidenza nell'uomo.

1.1. Il microbiota intestinale

1.1.1. Definizione

Per microbiota intestinale si intende l'insieme dei microrganismi, dei loro geni e dei loro metaboliti, presenti nel tratto gastrointestinale umano².

A seconda del tipo di rapporto che il microbiota realizza con il proprio ospite parleremo di microrganismi simbiotici, commensali e/o patobionti: nel primo caso, sia il microbiota che l'individuo traggono un vantaggio dalla loro associazione, nel secondo caso, sono soltanto i microrganismi a trarre vantaggio dall'associazione con l'ospite, senza recare ad esso né danni né benefici ed infine, nel terzo caso, i batteri, innocui in condizioni normali, possono indurre un danno all'ospite in condizioni patologiche.

All'interno del tratto gastroenterico, le fonti di nutrimento del microbiota sono costituite essenzialmente dalle sostanze ingerite con la dieta dall'individuo e da varie componenti presenti a livello della mucosa intestinale, come muco e cellule epiteliali sfaldate.

Normalmente, il sistema immunitario dell'individuo e la microflora intestinale si trovano in una condizione di equilibrio dinamico che, in caso di alterazione della composizione della microflora, può essere perturbato e sarebbe associato con la comparsa di patologie gastroenteriche, come colon irritabile, malattie infiammatorie croniche, diverticolite e/o cancro del colon e sistemiche, come allergie, obesità, diabete di tipo 2 ed aterosclerosi³.

1.1.2. Composizione e localizzazione

Grazie allo sviluppo di nuove tecniche di biologia molecolare basate sul sequenziamento della subunità 16S dell'RNA ribosomiale, i ricercatori hanno potuto identificare nonché classificare i costituenti della microflora intestinale.

Questo complesso ecosistema comprende sia specie autoctone, ovvero microrganismi commensali acquisiti alla nascita o, come recentemente ipotizzato, trasferiti in fase prenatale dalla madre al feto poiché già presenti nel liquido amniotico, nella placenta o nel sangue del cordone ombelicale¹¹⁻¹¹³, sia specie transitorie di origine ambientale⁹.

Inoltre, in accordo con la localizzazione, il microbiota intestinale è costituito soprattutto da batteri anaerobi¹⁰, sia facoltativi che obbligati: tra i primi annoveriamo Lactobacilli e Streptococchi, Enterococchi e Enterobatteriacee, mentre nel secondo gruppo ritroviamo Bifidobatteri e Clostridi¹¹.

Nell'individuo adulto, i *phyla* batterici più rappresentati nella microflora intestinale sono *Firmicutes*, 72%, *Bacteroidetes*, 20% e *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, 5-8%¹². Al primo phylum appartengono più di 200 generi diversi, tra cui Bacilli, Cocchi e Clostridi, mentre nel secondo sono racchiusi più di 20 generi, tra cui *Bacteroides* e *Prevotella*¹³. Nel gruppo degli *Actinobacteria* ritroviamo i Bifidobatteri, mentre in quello dei *Proteobacteria* sono comprese le Enterobatteriacee ed *Escherichia coli*.

Nel complesso, la popolazione microbica gastrointestinale include dalle 500 alle 1000 specie differenti, appartenenti a 14 famiglie e a 45 generi, e distribuite su un'area totale di circa 300 m² di intestino. In totale, le cellule batteriche che costituiscono la microflora intestinale sono 10¹⁴, un numero 10 volte superiore a quello delle cellule eucariotiche umane⁴: è per questo che il microbiota intestinale umano contiene un numero di geni

almeno 100 volte superiore a quello dei geni che costituiscono il genoma umano e si può considerare un vero e proprio genoma supplementare per l'ospite, detto microbioma⁵.

Il microbiota intestinale, che include oltre il 70% dei microrganismi presenti nel corpo umano⁶, varia notevolmente a livello quantitativo e qualitativo nelle differenti porzioni del tratto gastrointestinale ed in particolare, la densità batterica aumenta in modo esponenziale passando dalla porzione superiore a quella inferiore dell'intestino. Nello stomaco e nel duodeno si registra una minore densità batterica (10^1 - 10^3 CFU/g), mentre nel tenue (digiuno e ileo), questa densità aumenta (10^4 - 10^7 CFU/g), per poi raggiungere il suo picco nel colon (10^{11} - 10^{12} CFU/g)⁷.

Le variazioni qualitative e quantitative che si registrano lungo tutto il tubo digerente dipendono da fattori batterici (es. capacità di adesione e attività metabolica) e da fattori legati all'ospite, che si suddividono in fattori estrinseci (es. dieta, assunzione di farmaci e fattori ambientali) ed intrinseci (es. pH, motilità e tempo di transito, muco, acidi gastrici e secrezioni gastrointestinali e presenza di ossigeno)⁸.

Così, il colon presenta un'alta densità batterica a causa del transito lento del materiale ingerito, ma anche del basso potenziale redox caratteristico di questo tratto ed è dunque l'unica porzione di intestino in cui la microflora si stabilizza in maniera permanente.

Viceversa, la popolazione batterica è scarsa nello stomaco a causa del pH estremamente acido dell'ambiente gastrico ed è costituita soprattutto da Lactobacilli, Streptococchi e Lieviti, che risiedono nello strato di mucosa che riveste l'epitelio gastrico.

Anche il duodeno è scarsamente colonizzato dalla microflora a causa del transito rapido del cibo ingerito, della secrezione dei fluidi biliari e pancreatici, che eliminano gran parte dei microrganismi presenti e dell'effetto dell'attività motoria propulsiva dell'intestino che ne impedisce la colonizzazione stabile del lume.

1.1.3. Sviluppo e modificazioni: il microbiota nel neonato e nell'adulto

La colonizzazione del tratto gastrointestinale da parte del microbiota inizia al momento della nascita e continua con l'avanzare dell'età fino a costituire una microflora specifica per ogni individuo¹⁴. È un processo complesso, che nelle sue fasi più precoci coinvolge diversi fattori che possono verificarsi durante la nascita (es. tipo di parto) oppure dopo la nascita (es. tipo di allattamento), ma anche prima della nascita e sono collegati alle condizioni di salute materne (es. stress e utilizzo di antibiotici)¹⁴. Infatti, sebbene il feto

sia da considerare sterile durante la sua vita uterina, la presenza di batteri nel liquido amniotico, nella placenta o nel sangue contenuto nel cordone ombelicale suggerisce l'esistenza di una trasmissione madre-feto di commensali anche in tale fase¹¹¹⁻¹¹³.

Dunque, anche il tipo di parto influenza notevolmente la composizione del microbiota dei neonati, ovvero i nati con parto naturale hanno una flora simile a quella vaginale materna¹⁵, mentre quelli nati con parto cesareo hanno una flora simile a quella cutanea materna¹⁶, presentando un ridotto numero di *Bacteroides* e Bifidobatteri, ed un numero maggiore di Clostridi.

Un altro fattore determinante nello sviluppo della flora intestinale durante il primo anno di vita del neonato è la modalità di alimentazione: nel neonato allattato al seno la flora è costituita prevalentemente da Bifidobatteri¹⁸, la cui crescita è promossa dai complessi oligosaccaridi presenti nel latte materno, mentre nella flora del neonato nutrito con latte artificiale possono essere presenti spesso anche specie potenzialmente patogene come *Escherichia coli* e *Clostridium difficile*, normalmente controllate dagli elementi presenti nel latte materno, come lattosio, glicoproteine, glicolipidi e oligosaccaridi¹⁷.

Nei primi tre anni di vita si verifica un cambiamento costante del microbiota, che riflette una fine regolazione dell'espressione genica all'interno dello stesso¹¹⁵. Successivamente la flora batterica rimane sostanzialmente stabile, sebbene possano verificarsi comunque delle variazioni in essa, ad esempio a seguito di un cambiamento delle proprie abitudini alimentari o dell'insorgenza di patologie.

1.1.4. Funzioni

La microflora intestinale svolge diverse funzioni che contribuiscono al mantenimento di uno stato di salute buono dell'individuo, tra cui quelle metaboliche, trofiche e di difesa ed ha un ruolo importante anche nella regolazione dell'immunità e dell'infiammazione sistemica¹⁹. Per quanto riguarda l'attività metabolica, è noto che la flora contribuisce alla produzione delle vitamine K e B12, della biotina e dell'acido folico, oltre ad intervenire nel metabolismo degli acidi biliari e della bilirubina, andando a formare gli acidi biliari secondari mediante deconiugazione e deidrossilazione di quelli primari.

Il microbiota partecipa anche al processo di fermentazione saccarolitica, tramite il quale i polisaccaridi non digeribili come cellulosa, gomme e pectine sono convertiti in sostanze volatili (es. anidride carbonica) e acidi grassi a catena corta o SCFA (es. acido propionico

e acido butirrico). Gli SCFA migliorano l'assorbimento di calcio, magnesio e ferro, sono fondamentali nel mantenere un'acidificazione ottimale del pH intestinale, che costituisce un efficiente sistema di difesa contro i patogeni²⁰, e la loro produzione stimola la crescita e la proliferazione/differenziazione delle cellule intestinali epiteliali. L'acido butirrico è la principale fonte di energia delle cellule epiteliali del colon e ha un'azione antitumorale (modulando la crescita e differenziazione nelle linee cellulari tumorali epiteliali *in vitro* e favorendo il ritorno ad un fenotipo non neoplastico, attraverso il blocco dell'espressione della cicloossigenasi-2 e l'induzione di apoptosi in adenomi e carcinoma del colon²¹⁻²²). Per quanto riguarda l'attività di difesa e di modulazione del sistema immunitario, la flora residente costituisce una valida linea di resistenza alla colonizzazione da parte di batteri esogeni, indirettamente, competendo per i loro siti di attacco sull'orletto a spazzola delle cellule epiteliali intestinali e direttamente, producendo sostanze antibatteriche²³. Sistema immunitario e microbiota sono in perenne equilibrio tra loro: quando la mucosa intestinale innesca il sistema immunitario innato tramite i Toll-like receptors o TLR, che riconoscono e legano varie macromolecole microbiche (es. lipopolisaccaride, flagellina e peptidoglicano), su di essa si avvia una cascata di segnali che portano alla produzione e al rilascio di peptidi, citochine e fagociti che contribuiscono alla difesa dell'organismo. È utile quindi che il sistema immunitario intestinale non reagisca in modo incontrollato al microbiota, così da scongiurare la possibilità di sviluppare malattie autoimmuni. Lo studio del microbiota e del ruolo che ricopre nell'ambito della salute umana ha spinto i ricercatori a cercare di modificare questo microhabitat, tramite l'utilizzo di antibiotici o la variazione della dieta, ma soprattutto la somministrazione di batteri probiotici.

1.2. Probiotici e prebiotici

1.2.1. Probiotici: definizione e funzioni

Il termine probiotico, che è stato coniato da Lilly e Stillwell nel 1965²⁸, nasce dall'unione della preposizione latina *pro* ("a favore di") e dell'aggettivo greco *βιωτικός* ("biotico") contenente il sostantivo *βίος* ("vita")¹¹⁶, pertanto esso significa "a favore della vita". In base alla definizione del ricercatore inglese Fuller del 1989, l'OMS definisce probiotici tutti "quei microrganismi viventi che, se somministrati in quantità adeguate, esercitano un effetto positivo sulla salute dell'ospite rafforzando l'ecosistema intestinale"²⁴⁻²⁶.

Il primo a teorizzare su un ruolo protettivo dei batteri vivi assunti con la dieta fu il russo Eli Metchnikoff, premio Nobel per la medicina nel 1908 proprio per questa scoperta: egli studiò la vita e le abitudini alimentari dei pastori caucasici, e notando quanto facessero largo uso di latte fermentato, volle valutare i suoi effetti benefici sulla salute umana.

I probiotici per essere tali devono rispettare certe proprietà, ovvero devono essere:

- sicuri per l'impiego nell'uomo; in Europa un utile riferimento in questo senso può essere la lista delle specie batteriche qualificate presuntivamente come sicure dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare o EFSA, ossia che non risultano portatrici di antibiotico-resistenze acquisite e/o trasmissibili;
- attivi e vitali a livello gastrointestinale, in quantità tali da giustificare gli eventuali effetti benefici osservati in studi di efficacia;
- in grado di persistere e moltiplicarsi nell'intestino umano, ossia devono resistere all'elevata acidità dei succhi gastrici, pancreatici e della bile;
- capaci di conferire benefici fisiologici osservati tramite studi effettuati seguendo le linee guida dettate della FAO/OMS.

Sulla base di tali caratteristiche sono considerati microrganismi probiotici i Lactobacilli (es. *Lactobacillus acidophilus*, *casei*, *lactis* e *bulgaricus*) e i Bifidobatteri (es. *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum*)²⁹.

È inoltre importante sottolineare come gli effetti biologici prodotti dai probiotici siano ceppo-specifici, tanto che l'utilizzo di un nuovo ceppo batterico, anche se appartenente ad una specie già impiegata, richiede una nuova valutazione della sicurezza ed efficacia.

Nel suo insieme la classe dei probiotici svolge molte ed importanti funzioni nell'ambito del mantenimento di uno stato di salute buono dell'individuo²⁷.

Innanzitutto, poiché i Lactobacilli sono in grado di convertire il lattosio in acido lattico (fermentazione lattica), la loro assunzione può aiutare gli individui intolleranti a questo zucchero a digerirne più di quanto riuscirebbero altrimenti¹¹⁷. Questo effetto benefico è possibile grazie al rilascio da parte di questi batteri dell'enzima β -galattosidasi, in grado di scindere il lattosio nelle sue componenti più digeribili glucosio e galattosio.

Come indicato da molte meta-analisi¹¹⁸⁻¹²³, i probiotici bloccano efficacemente la diarrea associata agli antibiotici o AAD, una condizione patologica che, causando un'alterazione del microbiota, produce dei cambiamenti nel metabolismo dei carboidrati, con il ridotto

assorbimento di acidi grassi a catena corta e una conseguente diarrea osmotica. Questo processo, inoltre, può favorire la proliferazione di patogeni come *Clostridium difficile*.

I Lactobacilli sono poi considerati utili anche nel trattamento negli adulti delle infezioni sostenute da *Helicobacter pylori*, in associazione ai farmaci che vengono normalmente utilizzati per la sua eradicazione; in particolare, da studi recenti è emerso che l'aggiunta di yogurt contenenti probiotici alla tripla terapia convenzionale, nonostante lasci il tasso di eradicazione del batterio invariato, sia in grado di ridurre la frequenza di stomatite e costipazione correlate alla sua presenza nello stomaco¹²⁴.

Molte patologie gastrointestinali come la sindrome del colon irritabile, i linfomi e anche l'obesità trovano una possibile causa nell'alterazione del microbiota¹²⁵, tanto da indicare come strategia terapeutica adiuvante l'uso dei probiotici assunti con l'alimentazione¹²⁶.

Infine, è stato dimostrato in studi di laboratorio che alcuni Lactobacilli (es. *Lactobacillus bulgaricus*) hanno un effetto anti-mutageno, dovuto presumibilmente alla loro capacità di legarsi alle ammine eterocicliche, prodotte durante il processo di cottura dei cibi dalle sostanze cancerogene contenute nella carne¹²⁷. Studi sugli animali hanno dimostrato che alcuni ceppi di Lactobacilli possono avere un effetto protettivo nei confronti del tumore al colon nei roditori, mentre quelli effettuati sull'uomo sono ancora insufficienti e spesso discordi tra loro¹²⁷. La maggior parte di essi ha dimostrato che i ceppi batterici utilizzati possono avere degli effetti anti-tumorali mediante la riduzione dell'attività di un enzima noto col nome di β -gluconoridasi, che può generare carcinogeni a livello intestinale¹²⁸.

1.2.2. Prebiotici: definizione e funzioni

La FAO definisce prebiotico "un costituente degli alimenti non vitale e non digerito, che conferisce benefici alla salute tramite una modulazione del microbiota intestinale"³⁰.

Tra le diverse sostanze che possono essere considerate dei prebiotici ritroviamo le fibre idrosolubili, β -glucani e fructani, gli oligofruttosaccaridi o FOS, dei quali il più studiato è l'inulina, e il lattulosio. La loro funzione è quella sostenere la crescita e la proliferazione di una o più specie batteriche "buone" nel colon, capaci di modulare l'equilibrio esistente nella microflora intestinale endogena³¹.

Molti cibi che assumiamo normalmente contengono prebiotici, come frumento e germe di grano, miele, aglio e cipolla e legumi, ed inoltre, essi sono presenti anche nei principali alimenti fermentati come il pane, la pizza e naturalmente lo yogurt.

I prebiotici, insieme agli specifici probiotici per cui rappresentano il nutrimento, danno origine ai cosiddetti prodotti simbiotici, che dimostrano di solito un'efficacia maggiore rispetto a quella delle due sostanze assunte singolarmente³².

1.3. Cancerogenesi della mucosa colica

1.3.1. Polipi intestinali

1.3.1.1. Definizione e caratteristiche

I polipi intestinali sono protuberanze patologiche che sporgono nel lume dell'intestino e che solitamente prendono origine dalla mucosa sottostante.

A livello del tratto gastrointestinale si localizzano comunemente nel colon, ma possono ritrovarsi anche nell'esofago, nello stomaco e nel piccolo intestino.

Da un punto di vista morfologico possono essere di tipo sessile o peduncolato: nel primo caso hanno una struttura cupoliforme connessa ad una larga base di impianto, mentre nel secondo caso appaiono come lesioni fungiformi, costituite da una testa più grande del peduncolo³³.

Istologicamente, invece, i polipi si dividono in non-neoplastici e neoplastici^{34, 35}.

1.3.1.2. Polipi non-neoplastici

Si suddividono in polipi infiammatori, polipi iperplastici e polipi amartomatosi.

I polipi infiammatori, come suggerisce il nome, originano dalle cicatrizzazioni di lesioni infiammatorie, sono costituiti da una componente ghiandolare, presente in proporzioni variabili, e da uno stroma infiltrato da cellule infiammatorie e sono spesso riscontrabili in patologie infiammatorie croniche dell'intestino.

I polipi iperplastici sono i più frequenti, si diagnosticano principalmente in età avanzata (intorno ai 50 anni), hanno origine da proliferazioni secondarie della mucosa ad alterato turnover epiteliale/stromale e la loro sede primaria d'insorgenza è il colon distale, dove appaiono come escrescenze di dimensione inferiore ad 1 cm.

È opportuno sottolineare che i polipi iperplastici non sono lesioni precancerose, tuttavia possono diventarle se compaiono su di essi foci di atipia citologica e strutturale.

Si realizza così il fenotipo misto iperplastico-adenomatoso, che può evolvere in seguito in adenocarcinoma.

I polipi amartomatosi, infine, possono essere sporadici o associati a sindromi genetiche (es. la sindrome di Peutz-Jeghers e la poliposi giovanile) e dei vari polipi non-neoplastici sono quelli a minore riscontro percentuale. Essi derivano dalla proliferazione di diverse componenti della mucosa (es. le miocellule lisce, il tessuto stromale e quello ghiandolare mucosecernente) e benché le loro sedi prevalenti d'insorgenza siano il colon e l'intestino tenue, talvolta sono riscontrabili anche nello stomaco.

Il rischio di trasformazione neoplastica di questi polipi è nullo o basso.

1.3.1.3. Polipi neoplastici o adenomi

I polipi neoplastici, o adenomi, sono neoplasie intraepiteliali di tipo benigno circoscritte alla membrana basale (non invasive) e che derivano dalle cellule epiteliali delle cripte³⁶.

La loro incidenza aumenta all'aumentare dell'età, tanto che sono più frequenti dopo i 50 anni^{37, 38} e possono essere osservati mediante la colonscopia, un esame diagnostico che consente di identificare eventuali lesioni precancerose, come i polipi adenomatosi.

Questo tipo di polipi ha delle dimensioni variabili che vanno da 0,3 ai 10 cm di diametro e si contraddistingue per una certa atipia citologica e strutturale, ovvero può presentare displasia di grado più o meno elevato. Il rischio di cancerizzazione aumenta in base alle dimensioni e al grado di atipia strutturale.

I polipi neoplastici del grosso intestino si classificano in adenomi polipoidi convenzionali e adenomi piatti, adenomi serrati e adenomi serrati sessili.

Gli adenomi piatti, in base alla loro architettura, sono suddivisi in tubulari, tubulo-villosi e villosi, secondo un ordine decrescente di frequenza e crescente di atipia strutturale.

I polipi serrati condividono la loro architettura "dentellata" con i polipi neoplastici, che caratterizza soltanto la superficie di questi ultimi, mentre si estende a tutta la lunghezza della ghiandola, compresa la cripta, nel polipo serrato³⁹ e si localizzano principalmente nel colon sinistro, al contrario dei cosiddetti polipi serrati-sessili che sono localizzati più frequentemente nel colon destro.

Gli adenomi sono per la maggior parte dei casi asintomatici, ma talvolta possono causare anemia da stitico ematico o ematochezia o, qualora siano di grandi dimensioni, sono causa di dolori addominali e persino di un'occlusione intestinale.

1.3.2. Carcinoma colo-rettale

1.3.2.1. *Epidemiologia e prognosi*

Il carcinoma colo-rettale (CCR) o adenocarcinoma è una neoplasia epiteliale maligna che ha derivazione ghiandolare ed è molto frequente nei paesi occidentali, dove è il tumore più diagnosticato dopo quello polmonare nell'uomo e quello mammario nella donna.

Rappresenta la seconda causa di morte cancro-relata⁴⁰ e la sua incidenza differisce tra le diverse aree geografiche mondiali, variando dai 45 casi/100.000/anno in Nord America e Australia ai 3-6 casi/100.000/anno in Asia del Sud e in Nord-Africa, mentre in Europa si ha un'incidenza intermedia stimata in 36 casi/100.000/anno⁴¹.

In Italia si stima che ogni anno vengano effettuate circa 48.000 nuove diagnosi di CCR e che 16.000 persone muoiano a causa delle complicanze legate a questa neoplasia.

Il CCR colpisce con una leggera prevalenza il sesso maschile e la sua incidenza aumenta con l'aumentare dell'età, tanto che la maggior parte dei casi, circa il 90%, è diagnosticata dopo i 50 anni, mentre risulta molto raro sotto i 45 anni.

Nell'ultimo quarto di secolo, nei paesi industrializzati, si è registrata una netta riduzione dell'incidenza di CCR e della mortalità legata ad esso, che è dovuta molto probabilmente alla possibilità di eseguire diagnosi più precoci grazie alla diffusa adesione ai programmi di screening e ad una maggiore efficacia dei trattamenti medici e chirurgici.

Viceversa, nei paesi in via di sviluppo, si rileva un costante aumento di casi di carcinoma colo-rettale, nonostante la sua incidenza rimanga globalmente più bassa.

La prognosi del CCR è influenzata dallo stadio raggiunto dalla malattia al momento della diagnosi, tanto che la sopravvivenza globale a 5 anni in pazienti affetti da questo tumore nei paesi industrializzati è del 65% in media¹²⁹, considerando che la maggior parte delle diagnosi avviene allo stadio III della malattia. È quindi chiaro che una diagnosi precoce può incidere in modo determinante sull'esito di un eventuale trattamento chirurgico e/o terapeutico e più in generale, sul decorso della malattia.

1.3.2.2. *Eziologia e fattori di rischio*

La maggior parte dei carcinomi colo-rettali (oltre 90%) è di origine sporadica, mentre circa il 5% è di tipo ereditario⁴² ed insorge nel contesto di varie sindromi geneticamente determinate (es. la sindrome di Lynch e la poliposi adenomatosa familiare)^{43, 44}.

Nonostante l'eziologia del tumore del colon-retto sia ancora sconosciuta, il suo carattere multifattoriale suggerisce che fattori ambientali e suscettibilità genetica possano avere un ruolo preponderante nella genesi di questo tumore.

Tra i fattori favorevoli allo sviluppo del CCR ritroviamo una dieta ricca di grassi animali e povera di fibre, in cui ad esempio si ha un consumo eccessivo di carni rosse, soprattutto se lavorate⁴⁵, uno stile di vita sedentario, l'obesità⁴⁶, il fumo di sigaretta⁴⁷, un consumo eccessivo di alcool⁴⁸, la presenza di diverticoli del colon oppure malattie infiammatorie croniche intestinali. A questi fattori va aggiunto quello forse più importante, ovvero l'età avanzata, sia per l'aumento della frequenza dei polipi del colon e sia per il lungo periodo di esposizione a cancerogeni ambientali che la caratterizza.

Tra i fattori protettivi, invece, ritroviamo una dieta ricca di frutta e di verdura, l'attività fisica moderata e regolare, e inoltre, come è stato dimostrato recentemente, l'assunzione giornaliera di basse dosi di acido acetilsalicilico (ASA) per lunghi periodi (ovvero almeno 6 anni) o di farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS)^{49, 50}.

1.3.2.3. Storia naturale e alterazioni molecolari

Nel corso degli anni numerosi studi hanno dimostrato che, solitamente, la carcinogenesi del carcinoma colo-rettale è un processo multistep progressivo, definito generalmente "sequenza adenoma-carcinoma"⁵¹.

Il processo, secondo un modello sequenziale ipotizzato per la prima volta dall'americano Vogelstein nel 1988, prevede una fase di "iniziazione", nella quale si ha la trasformazione dell'epitelio normale in adenoma, seguita da una fase di "promozione" con l'evoluzione da adenoma a cancro⁵².

Come si è detto, gli adenomi costituiscono i precursori del CCR, tuttavia solo il 6% circa degli adenomi degenera in carcinoma e ciò dipende da diversi fattori, tra cui la variante istologica dei polipi adenomatosi, le dimensioni (se maggiori di 2 cm) ed il numero totale dei polipi, direttamente proporzionale al rischio di trasformazione.

Ogni trasformazione è conseguenza dell'accumulo sequenziale di alterazioni genetiche e epigenetiche, che agiscono sui geni oncosoppressori, oncogeni e/o sui geni che svolgono un ruolo chiave nella riparazione del DNA⁵³. Nello specifico, le alterazioni genetiche sono riconducibili nella totalità dei casi ad un'instabilità cromosomica (CIN), ad un'instabilità dei microsatelliti (MSI) e ad un'instabilità delle isole CpG (CIMP)⁵⁴.

La prima causa di insorgenza del CCR familiare e sporadico è l'instabilità cromosomica (CIN), caratterizzata da una modificazione quantitativa (detta aneuploidia) e funzionale del DNA⁵⁵, soprattutto a carico dei geni APC, KRAS, SMAD4 e p53.

L'evento precoce iniziale della "sequenza adenoma-carcinoma" è la mutazione del gene oncosoppressore APC, il quale inibisce la β -catenina, coinvolta nella via di segnalazione intracellulare WNT. La perdita di funzione di APC, causata dalla mutazione di entrambi gli alleli del gene sul cromosoma 5, provoca l'accumulo intracellulare di β -catenina, che traslocando nel nucleo, attiva la trascrizione di quei geni promuoventi la proliferazione cellulare (es. c-MYC e ciclina D1).

Nella poliposi adenomatosa familiare (FAP), ad esempio, cioè una patologia autosomica dominante, una mutazione di APC provoca lo sviluppo di centinaia di polipi adenomatosi nel colon-retto sino dalla tarda infanzia, col rischio di evoluzione in CCR in età giovanile del 100 % (a 30-40 anni).

KRAS è un oncogene la cui mutazione, presente nel 40% degli adenomi e carcinomi⁵⁶, si riscontra nella fase iniziale della conversione da adenoma a carcinoma. È una mutazione del tipo "gain of function", cioè la proteina GTPasi codificata dal gene KRAS rimane nello stato attivato e promuove la proliferazione cellulare⁵⁷.

SMAD2 e SMAD4 sono due geni oncosoppressori che, diversamente da KRAS, mostrano una mutazione di tipo "loss of function", cioè perdono la loro capacità inibitoria sul ciclo cellulare determinando una crescita autonoma incontrollata della cellula tumorale.

Infine, TP53 è un gene oncosoppressore che codifica per la proteina p53, il "guardiano del genoma", per il suo ruolo chiave nel prevenire i danni al DNA, mediante l'attivazione della sua riparazione o l'induzione dell'apoptosi nella cellula.

Questo tipo di mutazione, tardiva e rilevante nella fase di trasformazione da neoplasia non-invasiva, o NIN, di alto grado a carcinoma infiltrante, è presente nella maggior parte dei carcinomi (in più del 60%), mentre è rara negli adenomi⁵⁸.

L'instabilità dei microsatelliti, ossia sequenze di uno, due o tre nucleotidi irregolarmente disperse nel DNA e suscettibili a errori durante la replicazione, è coinvolta nello sviluppo del 15% dei CCR sporadici e di oltre il 95% delle forme ereditarie associate alla sindrome di Lynch (HNPCC). Alla base di questa instabilità, che porta ad un incremento del rischio di mutazioni, vi è un deficit nel sistema del mismatch repair del DNA (MMR), un insieme di geni (hMLH1 e hMSH2) che preserva la stabilità del DNA durante la ricombinazione e la replicazione, evitando l'errato appaiamento dei nucleotidi.

I CCR che originano dall'instabilità dei microsatelliti sono più frequentemente localizzati nel colon destro e presentano un tipico istotipo mucinoso (o medullare), con infiltrazioni linfocitarie peritumorali e intratumorali⁵⁹.

Nel caso della HNPCC, una sindrome genetica autosomica dominante che insorge in età precoce (prima dei 50 anni), con lo sviluppo di diverse neoplasie maligne, la mutazione che ne causa l'insorgenza riguarda, nel 40% dei casi, hMLH1 e nel 45%, hMSH2.

L'ipermetilazione delle isole CpG, presenti sui promotori di alcuni geni oncosoppressori e dell'oncogene BRAF, provoca il silenziamento dell'espressione di tali geni ed il CCR che si sviluppa quando queste isole CpG divengono instabili deriva da polipi serrati, secondo una progressione che a partire dal polipo iperplastico e passando per l'adenoma serrato porta all'adenocarcinoma⁶⁰.

La mutazione di BRAF, in particolare, avviene precocemente nel "pathway serrato" e può essere riscontrata nel 90% dei CCR che si sono evoluti da adenomi serrati sessili, mentre non è quasi mai presente negli adenomi convenzionali.

L'infiammazione cronica ha un ruolo fondamentale nell'iniziazione e nella progressione del CCR. Questa osservazione è supportata dalla forte associazione tra IBD e CCR e dalla scoperta degli effetti positivi a lungo termine di farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) e dell'aspirina nella prevenzione della neoplasia^{61, 62}.

Tra i meccanismi dell'infiammazione che predispongono all'insorgenza di CCR troviamo l'attivazione dei sistemi anti-apoptotici che stimolano la proliferazione cellulare, i danni al DNA mediante la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di specie reattive dell'azoto (RNS), la produzione di fattori di crescita ed i cambiamenti di conformazione delle membrane che facilitano l'invasione e l'adesione cellulare⁶³⁻⁶⁵.

1.4. Relazione tra microbiota e tumore del colon-retto

Una relazione tra il microbiota intestinale e i tumori del colon-retto è stata ipotizzata più volte, soprattutto per il forte legame esistente tra questo tipo di neoplasia e la dieta.

Nel 1975, Reddy e i suoi colleghi, scoprirono che l'incidenza di CCR, pari al 20% nei topi trattati chimicamente allo scopo di far sviluppare loro il tumore, toccava il 93% in quelli convenzionali non trattati⁶⁶.

Studi epidemiologici effettuati in passato hanno tentato di mettere a fuoco le differenze che esistono a livello qualitativo tra la flora intestinale delle popolazioni ad alto rischio

di insorgenza di CCR e quella delle popolazioni in cui questo rischio è ridotto ed è stato mostrato il possibile ruolo nella cancerogenesi di alcune specie batteriche, contrapposte ad altre specie associate, invece, ad un ridotto rischio di insorgenza della neoplasia⁶⁷. Lo sviluppo di metodiche di biologia molecolare sempre più efficaci ha reso possibile uno studio sicuramente più approfondito del microbiota e delle funzioni che svolge, tuttavia la caratterizzazione dei processi tramite i quali i microrganismi sarebbero coinvolti nella cancerogenesi è tuttora difficile, sia a causa della complessità e della durata dell'intero processo di sviluppo dei tumori sia per la grande eterogeneità del microbiota. Questo rende ancora difficile eseguire studi clinici *in vivo*, e la maggior parte dei dati disponibili a riguardo deriva da sistemi sperimentali e *in vitro*, volti a valutare gli effetti di alcuni specifici batteri. Quelli che si ottengono sono risultati molto contrastanti, dal momento che alcuni mostrano un ruolo pro-carcinogenetico del microbiota e altri ne evidenziano uno diametralmente opposto.

1.4.1. Ruolo pro-carcinogenetico del microbiota

I microrganismi intestinali potrebbero favorire l'insorgenza delle neoplasie in due modi diversi: un primo meccanismo implica l'attivazione delle vie di segnalazione che passano per i TLR, portando ad un'inflammatione cronica della mucosa che è legata a sua volta ad un aumento del rischio d'insorgenza del cancro, come nel caso dei carcinomi associati alle IBD. Un secondo meccanismo coinvolge invece le attività metaboliche del microbiota intestinale, capace di produrre delle tossine con un effetto pro-carcinogenetico diretto o enzimi in grado di attivare i carcinogeni ingeriti con la dieta.

1.4.1.1. Microbiota ed infiammazione

La correlazione tra infiammazione e cancerogenesi è ben nota⁶⁸⁻⁷⁰ e sembra addirittura che fino al 15% dei tumori nell'uomo sia associato all'infiammazione⁷¹.

Nel colon, un esempio di tale correlazione è dato dal colitis-associated cancer (CAC), che insorge in pazienti affetti da IBD: in tal caso, l'infiammazione cronica precede lo sviluppo del tumore, e mediante la produzione di ROS e di RNS, induce mutazioni e danni a livello del DNA, che contribuiscono alla trasformazione neoplastica dell'epitelio. Nel CCR di tipo sporadico è invece piuttosto difficile che l'infiammazione possa costituire il solo evento

scatenante, mentre è possibile che, tramite i danni al DNA che causa, possa contribuire all'accumulo delle alterazioni che innescano il processo neoplastico⁷².

Come abbiamo visto in precedenza, il microbiota svolge importanti funzioni immunitarie e metaboliche ed interviene nel controllo delle vie di trascrizione di alcune citochine infiammatorie. In condizioni normali vi è un equilibrio tra la produzione di citochine anti-infiammatorie, come IL-10, e pro-infiammatorie, come IL-17, mentre le variazioni del numero, della diversità e stabilità dei batteri commensali, e in particolare del gruppo dei Clostridi, possono produrre uno spostamento di questo equilibrio verso un fenotipo aggressivo pro-infiammatorio. Questa aumentata produzione di citochine, tra cui ci sono TNF α , IL-1 e IL-17, insieme all'attivazione dei TLR ad opera di alcuni patogeni, produce l'attivazione della cascata di NF-kB, un fattore di trascrizione di vari geni anti-apoptotici (come Bcl-2 e Bcl-xL) che, tramite l'aumento della proliferazione cellulare e dei processi di angiogenesi, è in grado di sostenere l'oncogenesi^{73,74}.

L'influenza dei commensali sull'infiammazione e la cancerogenesi è dimostrata da alcuni studi sui topi in cui, in condizioni germ-free, l'infiammazione intestinale e la formazione di tumori sono risultate significativamente ridotte rispetto ad animali posti in condizioni di normalità^{75,76}. Inoltre, questi topi germ-free presentavano un alto numero di cellule natural killer, linfociti B e T citotossici nel sangue periferico, indicativi di una migliore risposta immunitaria.

Questi studi confermano il ruolo del microbiota nei processi di trasformazione in senso neoplastico, anche se non tutti i batteri inclusi in esso sembrano avere la stessa capacità di causare tali patologie.

1.4.1.2. Microbiota e attivazione dei pro-carcinogeni

La capacità metabolica del microbiota intestinale risulta fondamentale nell'attivazione e nella detossificazione degli agenti carcinogeni, tuttavia, esso esprime anche molti enzimi (come β -glucosidasi, β -glucuronidasi, nitroreduktasi e alcool deidrogenasi), direttamente coinvolti nello sviluppo di certe forme neoplastiche.

I primi studi che hanno permesso di dimostrare questo coinvolgimento, sono stati fatti su dei topi germ-free che non sviluppavano tumori intestinali in seguito all'esposizione ad un certo carcinogeno, ma nei quali tali neoplasie insorgevano quando i topi venivano esposti direttamente al suo metabolita attivo, generato dall'azione della β -glucosidasi⁷⁷.

Le β -glucosidasi sono enzimi appartenenti alla classe delle idrolasi, che come suggerisce il nome, idrolizzano il legame glicosidico presente nei carboidrati, liberando in ogni ciclo catalitico, degli agliconi, alcuni dei quali possono avere degli effetti tossici.

Anche la β -glucuronidasi, un enzima espresso soltanto da alcuni batteri (es. Clostridi) ha un effetto negativo sull'insorgenza dei tumori ed in effetti, in campioni di feci di pazienti con CCR sono stati rilevati dei valori significativamente più elevati di attività di questo enzima rispetto a soggetti sani⁷⁸; tra gli agenti carcinogeni attivati dal microbiota e legati probabilmente all'attività della β -glucuronidasi vi sono alcune amine eterocicliche, come la 2-amino-3 metil-imidazo [4,5-f]chinolina (IQ), che si sviluppano durante il processo di cottura della carne rossa (un fattore di rischio noto per il CCR). Questi composti attivati sono in grado di formare addotti al DNA e di avere quindi un effetto mutageno^{79,80}.

Un ulteriore possibile meccanismo di cancerogenesi correlato al microbiota coinvolge la sintesi diretta di sostanze mutagene, come i fecapenteni prodotti dai *Bacteroides*, i ROS prodotti da *Enterococcus faecalis*^{83,84} o il solfuro di idrogeno prodotto dai microrganismi solfato-riducenti, che provocano danni al DNA e inducono trasformazione neoplastica.

Interessante è l'osservazione che alcuni commensali come i Bifidobatteri e i Lactobacilli hanno invece un ruolo opposto su questi agenti ed antagonizzano i loro effetti mutageni inattivando, forse, gli enzimi o legando direttamente l'agente carcinogeno IQ^{81,82}.

1.4.2. Ruolo anti-carcinogenetico del microbiota

Negli ultimi anni gli studi scientifici si sono rivolti specialmente verso il ruolo protettivo che i microrganismi svolgono nel controllo dei processi intrinseci epiteliali.

La complessa interazione che c'è tra la dieta, il normale microbiota intestinale e la salute ha promosso lo sviluppo di strategie, come l'uso dei probiotici, che potessero permettere la crescita selettiva di alcuni microrganismi ad azione benefica.

Nonostante non vi sia ancora un consenso unanime sul ruolo definito dei probiotici nella prevenzione del CCR, è riconosciuto che alcuni ceppi possono avere degli effetti benefici sulle attività metaboliche del tratto gastrointestinale e che possono stimolare la risposta immunitaria dell'ospite.

I meccanismi mediante i quali i probiotici e i prebiotici sarebbero in grado di coadiuvare la prevenzione/terapia dei tumori gastrointestinali non sono stati ancora chiariti, anche e soprattutto in considerazione del fatto che il microbiota può interferire a diversi livelli

nella sequenza adenoma-carcinoma: nella sua fase precoce di iniziazione, alcune specie batteriche, sia direttamente a causa di una maggiore fitness sia indirettamente mediante la competizione con altre specie pericolose, sono in grado di ridurre la concentrazione delle molecole carcinogenetiche nel lume colico. In uno stadio più tardivo, i commensali potrebbero controllare la proliferazione delle cellule displastiche regolando e inducendo l'apoptosi, sia direttamente con la produzione di molecole (es. SCFA) sia indirettamente tramite la stimolazione del sistema immunitario.

L'apoptosi è un complesso processo multistep importante per l'omeostasi della mucosa intestinale. In questa cascata di segnali intracellulari, che porta alla morte programmata della cellula, sono coinvolte varie molecole, tra cui le caspasi, che hanno un ruolo chiave. Nella fase iniziale della cascata interviene la caspasi 9, detta caspasi iniziatrice, la quale attiva diverse caspasi effettrici (es. caspasi 3) che agiscono nelle fasi finali. Una perdita di efficacia di tale via di segnalazione porterebbe ad un malfunzionamento del processo apoptotico, con proliferazione cellulare incontrollata, fino alla trasformazione maligna.

In linea con queste considerazioni è il modello sperimentale messo a punto *in vivo* sui topi e descritto in uno studio pubblicato recentemente⁸⁵: i topi, trattati con un regime terapeutico a base di quattro antibiotici in grado di eliminare parte della loro microflora intestinale, mostravano una riduzione dell'apoptosi rispetto ai controlli. Questi risultati erano confermati da un secondo studio *in vitro*, in cui dei campioni di mucosa intestinale incubati con specie probiotiche e estratti fecali presentavano una maggiore espressione di geni pro-apoptotici (caspasi 3 e 9), degli stessi campioni non trattati coi probiotici⁸⁵.

A livello intraluminale, i probiotici prevengono la colonizzazione della mucosa da parte dei batteri patogeni mediante un meccanismo di esclusione competitiva che si realizza con il consumo di nutrienti, la saturazione dei siti di adesione, la produzione di sostanze antimicrobiche e la stimolazione dell'organismo ospite a sintetizzarne a sua volta, come defensine, catelicidine e lectine di tipo C⁸⁶.

Inoltre, i probiotici possono inibire l'azione degli enzimi batterici della microflora, i quali sono responsabili dell'attivazione di pro-carcinogeni, come azoreduttasi, nitroreduttasi e β -glucosidasi^{87, 88} o possono inattivare mutageni e carcinogeni, legandosi direttamente ad essi e prevenendo così la loro interazione con le cellule del colon.

La produzione degli SCFA a partire dai carboidrati non digeribili è un altro meccanismo tramite cui il microbiota svolge un'azione anti-carcinogena. Gli effetti benefici degli SCFA sono stati rivelati da studi in cui popolazioni con una bassa incidenza di polipi coloretali

e CCR (es. africane) hanno mostrato un'alta concentrazione di SCFA nelle feci^{89, 90}.

Tra gli SCFA, quello maggiormente dotato di azioni anti-carcinogene è il butirrato, che è prodotto principalmente a livello del colon prossimale, dove determina una riduzione del pH, favorendo così la crescita di ceppi di Lactobacilli acido-resistenti.

Alcuni studi hanno dimostrato che il butirrato inibisce la proliferazione cellulare, induce l'apoptosi delle cellule tumorali^{91, 92}; inoltre, esso può ridurre l'espressione dell'enzima cicloossigenasi (o COX-2) nelle linee cellulari tumorali^{93, 94} e di indurre quella di un altro enzima, la glutatione-s-transferasi dell'ospite, ad azione detossificante.

Rilevanti sono anche gli effetti sul sistema immunitario, su cui i probiotici sono in grado di esercitare un'attività immunomodulatoria, grazie al riconoscimento di certe molecole presenti sulla loro superficie, i pathogen-associated molecular patterns (PAMP), da parte dei recettori TLR2 e TLR9, in particolar modo. Il segnale intracellulare che ne consegue stimola la produzione di citochine in grado di coordinare le specifiche risposte di cellule infiammatorie e di regolare l'attività di quelle immunocompetenti⁹⁵⁻⁹⁹.

Studi recenti hanno dimostrato che l'enzima COX-2 è implicato nello sviluppo delle IBD e del CCR¹⁰⁰: per l'induzione di tale enzima è necessaria l'attivazione di TLR4, un recettore associato al CAC^{101, 102}, inoltre, un'iperespressione di TLR4, rilevata nel colon di pazienti affetti da IBD ed in modelli sperimentali di colite, stimola l'attivazione di NF-kB, il quale a sua volta induce l'espressione di COX-2¹⁰³.

Uno studio, in particolare, ha evidenziato che diverse specie di probiotici sono in grado di inibire l'attivazione di NF-kB legata a TLR4, e ciò potrebbe determinare una riduzione dell'espressione di COX-2¹⁰³.

1.4.3. Modifiche a livello dell'ospite

Una delle strategie utilizzate dall'ospite per proteggere il microbiota consiste nel ridurre i contatti tra la superficie epiteliale ed i microrganismi, limitando così l'infiammazione tissutale e la traslocazione dei germi potenzialmente patogeni. Questa strategia è attuata grazie all'azione di cellule epiteliali, muco, immunoglobuline A, peptidi antimicrobici e cellule immunitarie, definiti nel loro insieme come "mucosal firewall"¹⁰⁴.

Il muco, in particolare, viene prodotto dalle cellule caliciformi mucipare e costituisce lo scudo primario contro i batteri patogeni. Inoltre, tutte le cellule epiteliali intestinali sono in grado di produrre peptidi antimicrobici capaci di attaccare la membrana cellulare

batterica e distruggerla¹⁰⁵. Tra tutti questi peptidi, un ruolo fondamentale è svolto dalle defensine, componenti essenziali del sistema immunitario innato dell'ospite, che sono sintetizzate e secrete da cellule costantemente esposte ai batteri ambientali; le defensine presentano residui carichi positivamente, in grado di legarsi alle membrane di numerosi batteri (soprattutto GRAM-) e di distruggerle, esercitando così un'azione antibatterica.

All'interno della loro struttura contengono 6 residui di cisteina ed in base alla posizione dei residui sono classificate in due grandi famiglie, le α - e le β -defensine. Le β -defensine sono più abbondanti nelle cellule epiteliali polmonari, cutanee ed urogenitali, mentre le α -defensine sono sintetizzate dai neutrofili (HNP1-4) e dalle cellule di Paneth intestinali (HD-5 e HD-6). In certi casi, queste molecole vengono espresse costitutivamente, mentre in altri casi è necessaria l'attivazione di pattern recognition receptors (PRR) per la loro produzione. I PRR sono dei recettori di membrana presenti sulla superficie delle cellule epiteliali della mucosa, capaci di riconoscere degli specifici antigeni presenti sui batteri patogeni. In questo gruppo di recettori troviamo i TLR, per il riconoscimento di molecole extracellulari ed i Nod-like receptors (NLR), per quelle intracellulari.

Come detto precedentemente, gli antigeni che vengono riconosciuti sono definiti PAMP e includono il lipopolisaccaride (LPS), i peptidoglicani, i lipidi, e le lipoproteine. Il legame dei PAMP con i PRR provoca l'attivazione di fattori di trascrizione (es. NF- κ B) che induce la produzione di citochine pro-infiammatorie e l'attivazione dei Linfociti T.

L'espressione delle α -defensine HD-5 e HD-6 potrebbe aumentare in risposta ad alcuni stimoli infiammatori, come avviene nelle malattie infiammatorie croniche intestinali¹⁰⁶.

Interessante è risultato il riscontro di un aumento della quantità di α -defensine nella mucosa, nel siero e nelle feci di pazienti affetti da CCR, tanto da essere proposto come metodica di screening precoce per il tumore¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Non è ancora chiaro il meccanismo alla base di questa variazione della quantità di α -defensine, ma è possibile che essa sia direttamente correlata con la proliferazione di cellule displastiche e conseguentemente con la loro trasformazione in senso neoplastico.

1.5. Metodi di studio del microbiota

Attualmente sono disponibili molte metodologie di studio del microbiota umano, che vanno da approcci più tradizionali, come quelli colturali, a tecnologie di sequenziamento del DNA di nuova generazione.

L'avvento di tecniche di biologia molecolare sempre più efficaci, in particolare, ha aperto nuove "strade" in questo settore della ricerca, facendo aumentare sempre più l'interesse dei ricercatori per il microbiota umano. Ciononostante, considerata la varietà di tecniche a disposizione, è fondamentale comprendere i vantaggi intrinseci ed i limiti di ciascuna di esse, così da consentire la scelta della più adatta da utilizzare.

1.5.1. Metodi classici

1.5.1.1. Colture in batch

Per più di un secolo i microbiologi hanno utilizzato delle metodiche colturali tradizionali in laboratorio, che consentono di isolare e studiare singole colonie batteriche allo scopo di descrivere le loro caratteristiche fenotipiche e le loro capacità metaboliche.

Grazie a questo tipo di approccio è stato possibile coltivare oltre 1000 specie batteriche distinte, isolate dal solo tratto gastrointestinale umano¹³⁰.

La forma più semplice di coltivazione batterica consiste nell'incubare campioni o singoli ceppi di una specie di interesse in un terreno di coltura completo, ossia contenente tutte le sostanze nutrienti per quel batterio, o selettivo, ovvero privo di qualche nutriente (che consenta, appunto, la selezione dei ceppi in grado di sopravvivere anche in sua assenza). Questo tipo di colture, definite in batch, permettono ai ricercatori di paragonare gruppi batterici di interesse, sulla base dei loro tassi di crescita e della produzione di metaboliti su diversi substrati o ancora, delle interazioni specie-specifiche che si formano¹³¹.

Molti batteri del microbiota, ad esempio, sono anaerobi obbligati, perciò possono essere rallentati nella crescita o eliminati del tutto fornendo ossigeno alle colture¹³² o possono essere favoriti nella crescita effettuando la loro coltivazione in camere anaerobiche¹³³.

Inoltre, la coltivazione di specie batteriche intestinali particolarmente esigenti dal punto di vista nutritivo può essere ottimizzata utilizzando terreni contenenti fluidi di bovino o estratti di feci o miscele di acidi grassi a catena corta^{134, 135}.

Le colture in batch presentano ovviamente delle limitazioni: innanzitutto, i risultati sono ottenibili solo per brevi periodi di tempo e comunque fino ad esaurimento delle sostanze nutritive presenti nel terreno di coltura o alla formazione in esso di sottoprodotti tossici per le specie batteriche di interesse, che ne limitano la crescita¹³⁶. Inoltre, l'allestimento di una coltura batterica può essere anche molto costoso, poiché può rendersi necessario

l'utilizzo di molti terreni di coltura differenti, per recuperare il numero più alto possibile di specie batteriche all'interno di un campione.

1.5.1.2. Colture continue

Un metodo più sofisticato di coltura batterica consiste nell'uso di sistemi definiti aperti o in continuo, come i fermentatori: diversamente dalle colture in batch, in un fermentatore è possibile introdurre continuamente fattori di crescita e nutrienti, rimuovendo al tempo stesso dal terreno di coltura, tramite appositi sistemi di drenaggio, i sottoprodotti tossici sintetizzati dai batteri e le eventuali cellule morte.

Tutti i sistemi di coltura in continuo raggiungono un loro stato di equilibrio che consente al ricercatore di esercitare un maggiore controllo sulle condizioni di crescita della specie batterica di interesse, per un tempo più lungo¹³⁷.

Questo tipo di sistemi è comunemente utilizzato per studiare il microbiota caratteristico del colon ed un certo numero di gruppi di ricerca usa fermentatori di ultima generazione nei quali è possibile eseguire colture con fasi di crescita sequenziali e distinte, allo scopo di riprodurre i molti cambiamenti ambientali che i microrganismi subiscono nel transito all'interno del tratto gastrointestinale¹³⁸.

1.5.1.3. Modelli animali

Le specie batteriche di interesse possono anche essere coltivate e mantenute in modelli animali, come è successo fino a poco tempo fa per i batteri filamentosi segmentati, i quali hanno dimostrato di avere importanti effetti pro-infiammatori nei topi¹³⁹.

I topi germ-free rappresentano un valido esempio di modello animale: come suggerisce il loro nome, sono animali del tutto privi di microrganismi sia internamente che a livello cutaneo, e per questa loro peculiarità sono particolarmente utili per lo studio dei batteri della microflora. Essi, infatti, possono essere inoculati facilmente con ceppi di interesse e consentono di studiare le relazioni batterio-ospite e batterio-batterio in modo semplice e intuitivo.

Molto utili nello studio del microbiota ma soprattutto del contributo genetico che questo offre al proprio ospite sono anche i topi knockout, animali geneticamente modificati allo scopo di valutare gli effetti della soppressione dell'espressione di un certo gene.

Questa soppressione è detta knockout genico ed è molto utile per studiare le interazioni tra le componenti genetiche dell'ospite e del microbiota¹⁴⁰.

Uno svantaggio di usare i modelli animali è che, mentre la composizione della microflora a livello di *phylum* sembra essere simile tra gli esseri umani e gli altri animali, a livello di specie e ceppi vi è una divergenza notevole, dovuta probabilmente alle differenze che esistono nella loro anatomia/fisiologia e nei loro regimi alimentari¹⁴⁰.

Infine, una limitazione nell'utilizzo dei modelli animali, ed in particolare, di quelli murini per lo studio del microbiota nasce dalla coabitazione degli animali: nei topi, infatti, sono frequenti gli episodi di coprofagia (ingestione di escrementi), che portano ad un rapido trasferimento dei batteri da un animale all'altro, stravolgendo completamente i risultati che si ottengono¹⁴¹.

1.5.2. Metodi basati sul sequenziamento

Di recente, lo studio del microbiota è stato completamente rivoluzionato dallo sviluppo di innovative tecniche di biologia molecolare, come il sequenziamento del DNA, divenute oggi decisamente più economiche rispetto agli anni precedenti.

Il settore della biologia molecolare è in costante sviluppo e si arricchisce continuamente di macchinari più efficaci, capaci di "leggere" miliardi di sequenze di DNA e di comparare tra loro segmenti di DNA anche molto lunghi, e sempre più piccoli, tanto da poter essere inseriti nella porta USB di un computer¹⁴².

Il vantaggio principale di questo tipo di approccio è che si ottengono risultati completi e molto esaustivi su un determinato campione, fornendo una visione panoramica di quello che rappresenta in termini microbiologici e inoltre, essendo meno laborioso rispetto alle tecniche microbiologiche classiche, è possibile effettuare ricerche su larga scala, evento impensabile in passato: ne sono un esempio il Progetto Genoma Umano ed il più recente progetto MetaHIT¹⁴³.

1.5.2.1. Sequenziamento dell'RNA ribosomiale

Un approccio comune basato sul metodo del sequenziamento consiste nell'eseguire delle indagini su alcuni geni marcatori universali, che forniscono una panoramica delle specie batteriche presenti nel microbiota.

I geni marcatori universali usati più frequentemente sono quelli contenuti nell'RNA delle subunità ribosomiali minori, dette 16S e 18S nei batteri e archeobatteri e negli eucarioti rispettivamente. All'interno di questi geni sono presenti sequenze altamente conservate nelle diverse specie batteriche e/o che sono spesso esclusive di un determinato gruppo batterico o genere¹⁴⁴, ma anche sequenze piuttosto variabili.

Questo tipo di sequenziamento sfrutta le regioni maggiormente conservate, infatti, dopo l'estrazione del materiale genetico dal campione di tessuto umano, i geni marcatori sono amplificati col metodo della reazione a catena della polimerasi (o PCR) usando sequenze di innesco, definite primer, molto specifiche per le regioni altamente conservate.

L'obiettivo finale è quello di creare un pool misto di prodotti di amplificazione che sono derivati dal maggior numero possibile di specie batteriche incluse nel campione biotico e che vengono successivamente sequenziati.

I dati risultanti sono poi raggruppati in unità tassonomiche operative (OTU), organizzati in differenti cluster di similarità di sequenza, e dovrebbero rispecchiare, con ragionevole approssimazione, l'insieme eterogeneo dei gruppi batterici inclusi nel campione. È utile sottolineare, tuttavia, che la grande variabilità nel numero di copie dell'RNA ribosomiale dei diversi ceppi batterici fa sì che i risultati non siano propriamente quantitativi¹⁴⁵, cioè che non diano informazioni riguardo alle quantità di batteri presenti.

Inoltre, la soglia di similarità di sequenza stabilita per determinare le OTU è arbitraria e soggettiva, e fa discostare i risultati ottenuti dalla reale composizione di generi batterici presenti nel campione.

Indipendentemente dalla soglia di similarità stabilita, le OTU possono essere confrontate con sequenze presenti in database come SILVA, RDP ed EzTaxon, allo scopo di assegnare loro una classificazione tassonomica¹⁴⁶.

Il sequenziamento dell'RNA ribosomiale può essere utilizzato anche per analizzare i geni meno diffusi all'interno del microbiota, giacché non ubiquitari ed espressi solo da alcune delle specie batteriche contenute in esso: un esempio di ciò è costituito dai geni espressi dai microrganismi presenti nel colon che producono butirrato e proprionato¹⁴⁷.

1.5.2.2. Sequenziamento completo del genoma

Il primo genoma batterico completamente sequenziato è stato quello del Gram-negativo *Haemophilus influenzae*, nel 1995¹⁴⁸, tramite l'uso del Metodo di Sanger¹⁴⁹.

Da allora, il miglioramento delle tecniche di sequenziamento del DNA ha consentito delle analisi genomiche complete estremamente rapide e ad un costo più basso¹⁵⁰.

Data la grande efficienza dei macchinari di sequenziamento di ultima generazione, come Illumina, è ormai possibile effettuare il contemporaneo sequenziamento di molti genomi batterici nella stessa sessione: l'approccio è basato sulla tecnica della PCR Multiplex, una variante della PCR che consente d'identificare in modo rapido delezioni e/o duplicazioni in un grande gene. Diversamente dalla PCR, la PCR Multiplex usa più set di primer in una unica miscela di reazione, portando all'amplificazione di ampliconi di varie dimensioni.

Analizzando più geni in un unico ciclo di PCR, le informazioni necessarie possono essere acquisite in un tempo estremamente piccolo, con un cospicuo risparmio economico.

Questo tipo di approccio è stato adottato anche nel Progetto Genoma Umano, una ricerca internazionale il cui obiettivo principale è stato quello di identificare e quindi localizzare sui cromosomi (mappare) i geni del nostro genoma.

Il progetto è iniziato nel 1990 ed anche se una prima bozza del genoma è stata rilasciata nel 2000, si è dovuto attendere fino al 2003 per avere i risultati completi, da cui si evince che il genoma è costituito approssimativamente da 21000 geni ed è lungo circa 3200Mb aventi funzioni diverse: 48Mb sono codificanti (1,5%), 1152Mb definiscono il cosiddetto gene-related DNA, un insieme di introni e pseudogeni (36%) e le restanti 2000Mb vanno a costituire il DNA intergenico, in cui ritroviamo sequenze ripetute intersperse chiamate LINE (21%), SINE (15%), LTR (9%), trasposoni (3%), sequenze ripetute in tandem dette microsatelliti (3%) ed una piccola percentuale di altri tipi.

1.5.2.3. Metagenomica

Un limite del metodo di sequenziamento completo del genoma è rappresentato dal fatto che i batteri di interesse devono essere necessariamente prima coltivati, così da ottenere una quantità di DNA sufficiente per le successive analisi, tuttavia, la maggior parte delle specie batteriche presenti nel microbiota non è stato ancora coltivato in laboratorio¹⁵¹.

Questo problema è stato bypassato grazie all'avvento della metagenomica, una metodica che consente ai ricercatori di ricavare sequenze genomiche di interesse dal DNA estratto da un campione ambientale; in seguito, essi tentano di confrontare bioinformaticamente le sequenze ottenute dal DNA estratto con altrettante sequenze note espresse da singole specie batteriche, escludendo quelle che non sono rilevanti per lo studio.

La metagenomica fu applicata per la prima volta allo studio del microbiota nel 2006¹⁵² e da allora è stata utilizzata in diverse occasioni. È una tecnica molto potente, con la quale è possibile determinare accuratamente la capacità funzionale di una comunità batterica di interesse, tuttavia, la complessità degli habitat batterici intestinali (es. colon) richiede un enorme lavoro di sequenziamento per ottenere dati sufficienti a comporre un quadro rappresentativo dei microbi presenti al loro interno.

Per queste sue caratteristiche, la metagenomica è anche la sola tecnica mediante la quale è possibile monitorare le comunità virali, definite viromi, presenti nel corpo umano, dato che non esistono, a oggi, geni marcatori universali espressi dai virus in modo ubiquitario e utilizzabili allo scopo come quelli dell'RNA ribosomiale nel caso dei batteri¹⁵³.

Esistono, ovviamente, delle limitazioni all'uso della metagenomica: in particolare, questo tipo di approccio è molto più esoso di altri poiché se si vogliono elaborare efficacemente i dati raccolti è necessario far ricorso ad infrastrutture bioinformatiche specializzate.

Ciò, impone ai ricercatori di limitare le dimensioni dei campioni da analizzare, rendendo proibitivi, nella maggior parte dei casi, studi metagenomici su larga scala.

1.5.2.4. Sequenziamento da singola cellula

Il sequenziamento da singola cellula (SCG) è una metodica emergente e complementare alla metagenomica, che consiste nell'isolamento di singole cellule batteriche da campioni ambientali e nella successiva amplificazione del loro intero genoma, allo scopo di sapere che funzioni specifiche è in grado di esprimere.

Questo tipo di approccio ha un senso soprattutto quando viene combinato con tecniche di selezione cellulare, come l'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH)¹⁵⁴ e/o la marcatura con gli isotopi stabili, che consentono al ricercatore di recuperare, potenzialmente, delle cellule batteriche che derivano da uno specifico background filogenetico o che svolgono una particolare funzione.

Un limite all'utilizzo di questa metodica è rappresentato dalla possibile contaminazione della ridotta quota di DNA che può essere estratta da una sola cellula, che può interferire con gli strumenti impiegati per la sua amplificazione, determinando una decodificazione parziale del genoma¹⁵⁵.

Nonostante questo suo limite, di recente, il sequenziamento da singola cellula ha trovato applicazione nella caratterizzazione di batteri appartenenti a *phyla* poco esplorati, come

TM7 e *Chloroflexi*¹⁵⁶ e in generale, può essere usato in associazione con la metagenomica per l'ampliamento dei database di riferimento¹⁵⁷.

1.5.2.5. Metatrascrittomica

La metatrascrittomica, come suggerisce il nome, è lo studio dei trascritti di una comunità batterica, che ha come obiettivo l'identificazione delle funzioni svolte dai microrganismi che la compongono, in un dato momento ed in certe condizioni ambientali, diversamente dalla metagenomica che ne stabilisce il potenziale funzionale come valore assoluto.

Questa tecnica consiste innanzitutto nell'isolamento di RNA da un campione ambientale e nel suo successivo utilizzo per la creazione di "librerie" di cDNA retro-trascritti. Questi possono essere poi sequenziati e confrontati con database genomici di riferimento.

La metatrascrittomica è tecnicamente molto più impegnativa della metagenomica poiché richiede ulteriori fasi di lavorazione rispetto a questa, che consistono sia nella creazione di cDNA sia nell'eliminazione degli RNA ribosomiali dell'ospite e batterici dal campione di interesse, dove costituiscono la classe di RNA maggiormente rappresentata¹⁵⁸.

Le analisi del microbiota umano svolte tramite l'approccio della metatrascrittomica sono rese più complesse dal fatto che attualmente non esistono molti database di riferimento per i genomi dei batteri inclusi nel microbiota.

Un limite fondamentale della metatrascrittomica risiede nel fatto che a causa della breve emivita degli RNA messaggero (misurabile in pochi minuti)¹⁵⁹, responsabili del processo di trascrizione degli RNA, i risultati ottenuti tramite questo approccio potrebbero essere poco rappresentativi delle attività batteriche svolte *in situ*. Ciò significa, ad esempio, che l'attività trascrizionale batterica riscontrata in campioni fecali potrebbe essere discorde con l'espressione genica degli stessi batteri in un distretto come il colon prossimale.

1.5.3. Metodi molecolari

1.5.3.1. DNA Fingerprinting

Negli ultimi anni sono state sviluppate numerose tecniche di fingerprinting del DNA, che consentono di ottenere marcatori genetici universali utili allo studio dei genomi batterici e quindi, delle specie presenti in un determinato microhabitat (es. colon).

Queste tecniche sfruttano una caratteristica del genoma di tutti i microrganismi, ovvero i polimorfismi da lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP): *in primis*, dal campione di interesse si estrae e si purifica il DNA, *in secundis* tale DNA è sezionato in frammenti tramite enzimi di restrizione (endonucleasi), che eseguono i tagli solo in corrispondenza di particolari sequenze nucleotidiche, specifiche per ogni enzima.

I frammenti di restrizione vengono quindi separati per lunghezza mediante elettroforesi su gel di agarosio e poi, tramite la tecnica di ibridazione del Southern blot si identificano le bande generate dall'ibridazione con sonde di sequenza nota marcate radioattivamente o tramite fluorocromi. Le differenze tra i genotipi sono evidenziate dal numero di bande che appaiono utilizzando la stessa sonda per l'ibridazione, che è a sua volta determinato dal numero di siti di taglio presenti nella sequenza considerata.

Il limite principale dell'analisi degli RFLP è che richiede una grande quantità di materiale di partenza e che, anche in virtù di ciò, produce generalmente poche bande.

Un altro metodo estremamente sensibile per individuare i polimorfismi del DNA è detto amplified fragment length polymorphism (AFLP). A dispetto del nome, questo approccio è usato per evidenziare la presenza di un polimorfismo piuttosto che la sua lunghezza.

La differenza sostanziale tra la AFLP e la RFLP, che sta incentivando moltissimo l'utilizzo della prima tecnica, a discapito della seconda, risiede nel fatto che alla fase di digestione del DNA con uno o più enzimi di restrizione segue una fase nella quale le semi-sequenze di restrizione sui frammenti appena creati sono legate a degli specifici adattatori, ovvero frammenti di DNA a sequenza nota. Per questo motivo, la AFLP consente di individuare contemporaneamente diversi polimorfismi in varie porzioni genomiche e sta diventando rapidamente uno degli approcci più utilizzati per stimare la diversità genomica sia nelle popolazioni batteriche *in vitro* che *in vivo*.

1.5.3.2. DNA microarray

Un microarray di DNA, meglio noto come gene chip, consiste in una griglia microscopica di sonde di DNA attaccate ad un supporto solido, come vetro, plastica, o chip di silicio.

Questi microarray sfruttano una tecnica di ibridazione "inversa", che consiste nel fissare tutte le sonde (definite probe) di DNA sul supporto solido e nel marcare l'acido nucleico da identificare e consentono di controllare simultaneamente gli RNA prodotti da migliaia di geni, allo scopo di valutare le variazioni della loro espressione¹⁶⁰.

I microarray filogenetici, definiti spesso phylochips, sono molto utilizzati nello studio dei batteri presenti nel microbiota: questi consistono essenzialmente in un array contenente brevi oligonucleotidi (il cui target, solitamente, è rappresentato dagli RNA della subunità ribosomiale minore), che sono selezionati in modo da includere la gamma tassonomica dei microrganismi che si ipotizza siano presenti in un dato campione ambientale¹⁶¹.

Il DNA viene estratto dal campione di interesse, gli RNA ribosomiali vengono amplificati e marcati con un fluorocromo ed infine ibridizzati contro il microarray, cosicché quando degli spot di DNA del microarray presentano un segnale fluorescente si avrà il riscontro che la gamma tassonomica scelta include quella delle specie batteriche del campione.

Un limite importante di questo tipo di approccio è che, diversamente dalle varie tecniche di sequenziamento casuale, si può rilevare un numero contenuto di batteri, ovvero quelli la cui gamma tassonomica è inclusa nelle sonde attaccate al microarray. Fortunatamente sono ormai disponibili array comprendenti la gamma tassonomica completa delle specie batteriche presenti in particolari microhabitat associati all'organismo umano, come sono l'intestino o il cavo orale^{162, 163}.

1.5.4. Metodi quantitativi

Comprendono due tecniche molecolari largamente utilizzate, ovvero la PCR quantitativa (o anche detta Real-time PCR) e l'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH), che consentono un'enumerazione/quantificazione dei gruppi batterici presenti nel microbiota.

1.5.4.1. PCR quantitativa (o Real-time PCR)

È una tecnica basata sulla misurazione della fluorescenza emessa da un DNA di interesse durante l'amplificazione mediante PCR: la quantità di segnale generato e il tasso al quale tale segnale si accumula, all'aumentare del numero di cicli di PCR, consente di effettuare una misurazione della quantità di DNA target presente nel campione.

Questa tecnica è spesso impiegata per quantificare il numero totale di cellule batteriche contenute in un campione, ma può anche consentire la quantificazione delle popolazioni presenti in diversi gruppi batterici, utilizzando una serie di primer specifici¹⁶⁴.

La quantificazione eseguita mediante la Real-time PCR è piuttosto precisa, dal momento che possono essere accuratamente conteggiate densità cellulari dell'ordine di 10^1 - 10^3 .

Una limitazione della Real-time PCR è che consente di monitorare solo i gruppi batterici per cui sono stati costruiti degli specifici primer e pertanto, i gruppi esclusi non saranno quantificati, a meno che non siano utilizzati set di primer multipli.

1.5.4.2. Ibridazione fluorescente in situ (FISH)

Questa tecnica prevede che le cellule batteriche in esame siano prima fissate utilizzando agenti chimici (es. la formaldeide) e in seguito siano rese permeabili, così da consentirne l'accesso alle sonde oligonucleotidiche marcate con fluorescente.

Questi oligonucleotidi hanno una lunghezza di circa 15-30bp e sono creati comunemente per identificare le regioni di RNA ribosomiale di gruppi filogenetici prescelti¹⁶⁵.

Le sonde ibridano a qualsiasi sequenza di rRNA ad esse complementare, e dal momento che i ribosomi sono abbondanti e distribuiti uniformemente nella cellula batterica, fanno visualizzare subito, tramite microscopia a epifluorescenza, le cellule che hanno mostrato un segnale positivo¹⁶⁶. La FISH, oltre ad essere un approccio quantitativo, ha il vantaggio fondamentale, dunque, di consentire l'osservazione di cellule di interesse *in situ*, con cui è possibile definire con ragionevole accuratezza, ad esempio, la specifica composizione di gruppi batterici presenti sulla superficie delle mucose.

Tuttavia, ci sono anche alcune importanti limitazioni all'utilizzo della FISH: è una tecnica molto meno sensibile da un punto di vista quantitativo rispetto alla Real-time PCR, visto che è essenziale un elevato numero di cellule (nell'ordine delle 10⁶ per ml) nel campione per rendere possibile il loro conteggio visivo all'interno del campo microscopico.

1.5.5. Metodi funzionali

1.5.5.1. Metaproteomica

La metaproteomica è lo studio dell'insieme delle proteine/peptidi prodotti da comunità batteriche miste¹⁶⁷ e come tale, fornisce informazioni funzionali su di esse, consentendo ai microbiologi di monitorare le modificazioni nell'espressione delle proteine all'interno del microbiota, in risposta a cambiamenti delle normali condizioni ambientali.

Questo approccio prevede che le proteine siano prima estratte dal campione ambientale d'interesse e che siano poi separate per la loro caratterizzazione mediante spettrometria

di massa e per il loro successivo raffronto con dati bioinformatici di riferimento presenti nei principali database¹⁶⁸. In un recente passato le proteine/peptidi erano comunemente separati mediante l'elettroforesi su gel¹⁶⁹, mentre attualmente sono separati utilizzando la cromatografia liquida, due tecniche che condividono lo stesso principio, dal momento che separano le proteine in base al loro punto isoelettrico.

La metaproteomica offre dei vantaggi rilevanti rispetto alla metatrascrittomica, giacché avendo come obiettivo le proteine anziché gli RNA messaggero, fornisce una panoramica più ampia e rappresentativa delle attività funzionali svolte dal microbiota, dando anche una spiegazione ai processi di modificazione post-traslazionali¹⁷⁰.

Inoltre, le proteine/peptidi sono anche comunemente più stabili degli RNA messaggero e da ciò ne consegue che i risultati raggiunti non sono più condizionati anche dalla velocità con cui i campioni vengono elaborati.

Questo tipo di approccio, tuttavia, mostra anche una serie di limitazioni che non lo fanno preferire alle tecnologie basate sul DNA: attualmente, infatti, anche se la sua risoluzione sta migliorando, la metaproteomica non può discriminare che poche migliaia dei milioni di proteine/peptidi che potrebbero essere presenti, nello stesso tempo, in un complesso microbiota di un campione di interesse¹⁷¹.

Ciò significa che, ad oggi, solamente le proteine prodotte dai membri più rappresentativi del microbiota possono essere recuperate in misura ragionevole¹⁷².

1.5.5.2. Metabolomica

La metabolomica è lo studio dei metaboliti presenti in uno specifico campione al tempo di campionamento. Come la metaproteomica, dunque, essa permette di valutare l'attività funzionale svolta da una comunità batterica tramite il monitoraggio diretto dei prodotti finali del suo metabolismo¹⁷³.

Questo tipo di approccio prevede che i metaboliti, in genere isolati da campioni corporei quali urina, feci e sangue, siano stimati utilizzando diverse tecnologie, come la risonanza magnetica nucleare (NMR) e la microscopia/spettrometria di massa¹⁷⁴. Il risultato finale di questi approcci è una serie di specifici spettri (o picchi) di assorbimento, che derivano dalla gamma di metaboliti presenti nel campione¹⁷⁵.

Una limitazione fondamentale di questa metodica è che può essere difficile determinare con precisione quale specie batterica stia producendo quel particolare metabolita.

Si è tentato molteplici volte di correlare la produzione di metaboliti con la composizione batterica di un certo campione, tuttavia, gli approcci metagenomici impiegati allo scopo possono essere resi inefficaci dalla presenza di DNA derivato da specie morti o inattive. Inoltre, molti metaboliti, come gli acidi grassi a catena corta, sono rapidamente assorbiti dall'ospite, il che significa che i livelli di produzione non possono essere accuratamente definiti o attribuiti ad una particolare specie batterica¹⁷⁶. Infine, come succede per la metaproteomica, i limiti di risoluzione fanno sì che si possa monitorare accuratamente solo un piccolo sottoinsieme della vasta gamma di metaboliti che possono essere presenti in un complesso campione come le feci¹⁷⁷.

1.5.5.3. Marcatura con isotopi stabili

Un altro approccio funzionale molto applicato allo studio del microbiota è la marcatura con gli isotopi stabili (SIP). Tale tecnica prevede che le comunità microbiche di interesse siano incubate su substrati contenenti isotopi stabili, come ¹³C, ¹⁵N e ¹⁸O. A questo punto le specie che sono in grado di crescere sul substrato fornito, incorporeranno i marcatori degli isotopi nella loro biomassa cellulare, che potrà poi essere esaminata individuando gli elementi che la compongono, come il DNA/RNA, le proteine o gli acidi grassi derivati dai fosfolipidi, che risulteranno tutti marcati ovviamente.

Nei primi studi questa tecnica è stata usata "in tandem" con approcci di tipo molecolare e quantitativo (come RFLP e FISH), allo scopo di contraddistinguere le specie batteriche che erano in grado di utilizzare attivamente substrati marcati come l'oligofruttosio¹⁷⁸.

Un limite importante di questa tecnica è senza dubbio il costo elevato sia dei macchinari utilizzati sia dei materiali occorrenti ed in particolare, dei substrati marcati.

Inoltre, la marcatura con gli isotopi stabili richiede che i batteri crescano in presenza dei substrati marcati che, pertanto, non possono essere incorporati da cellule e/o organismi vitali. Ciò significa che le comunità batteriche da studiare vanno mantenute in condizioni artificiali di laboratorio, non consentendo così di ottenere risultati in grado di riflettere completamente l'attività svolta dal microbiota *in vivo*¹⁷⁹.

2. Scopo della tesi

Considerata la grande eterogeneità dei risultati ottenuti sinora relativamente ai rapporti tra microbiota e cancerogenesi colica, è ragionevole pensare che il ricorso alla medicina traslazionale, tramite il suo approccio multidisciplinare e altamente collaborativo, possa favorire un utilizzo più efficace e specifico di questi batteri nel trattamento delle IBD.

A tal riguardo, il ruolo di modelli “transizionali” appropriati, ovvero più rappresentativi delle condizioni che si verificano *in vivo* rispetto ai tradizionali sistemi *in vitro*, potrebbe essere di grande rilevanza, favorendo la transizione, appunto, di questi modelli in vere e proprie applicazioni cliniche.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare e sviluppare un modello “*ex vivo* organ culture” semplice, economico e riproducibile, che possa essere usato nello studio delle interazioni microflora intestinale-ospite, con particolare riferimento all’alterazione del normale equilibrio esistente tra microbiota e meccanismi molecolari proliferativi e/o infiammatori a livello della mucosa colica.

3. Materiali e metodi

3.1. Pazienti

Nello studio sono stati inclusi 74 pazienti, sottoposti a colonscopia completa per diverse indicazioni cliniche (come polipi adenomatosi e/o retto-coliti ulcerose) presso il reparto di Endoscopia Digestiva dell'Azienda Ospedaliera S. Andrea di Roma.

I pazienti che hanno aderito allo studio, approvato dalla Commissione Etica locale, hanno rilasciato il loro consenso informato, secondo le disposizioni di legge vigenti.

3.2. Campioni bioptici: il modello sperimentale *ex vivo*

Durante la colonscopia dei pazienti inclusi nello studio sono state raccolte alcune biopsie da segmenti sani (prossimale e distale) e patologici della mucosa del colon.

Le biopsie, appena prelevate, sono state sottoposte a lavaggio con soluzione fisiologica e pesate, per evitare differenze consistenti tra i campioni.

Al fine di valutare l'adesività di varie specie batteriche probiotiche su diversi segmenti sani di mucosa del colon e quindi, per confronto, su alcuni segmenti patologici sono state raccolte, da 18 pazienti, altrettante biopsie da polipi adenomatosi del tratto retto-sigma e, per controllo negativo, da mucosa sana adiacente.

Successivamente, le biopsie sono state poste in 200 μ l di terreno Roswell Park Memorial Institute (RPMI), in tubi Falcon da 2 ml, dove sono stati aggiunti 20 μ l (il 10% del volume totale) di una soluzione ottenuta dalla risospensione di 0,2 g di formulazioni monospecie (*Lactobacillus rhamnosus GG* o *LGG*) e multispecie (contenenti 8 ceppi diversi) di batteri probiotici in polvere in 1 ml di PBS oppure, per controllo negativo, in uno stesso volume di PBS senza alcun probiotico.

Infine, i tubi contenenti le biopsie sono stati incubati a 37 °C per 2 ore.

Al termine dell'incubazione, le biopsie sono state recuperate e sottoposte a due ulteriori lavaggi con il PBS, per rimuovere le specie batteriche non aderenti. In seguito, le biopsie sono state poste in uno stabilizzante (RNA Later) fino al successivo passaggio.

Le biopsie sono state omogeneizzate e da queste è stato estratto il DNA totale, analizzato mediante PCR, utilizzando dei primer specifici per diverse specie probiotiche, allo scopo di stabilire la concentrazione mucosale relativa di due specie incluse nella formulazione multispecie (*B. infantis* e *S. thermophilus*) e di *Lactobacillus rhamnosus GG*.

Allo scopo di valutare gli effetti prodotti sulla mucosa intestinale dai probiotici utilizzati nello studio, in termini di espressione di molecole pro-infiammatorie (es. α -defensine) e pro-apoptotiche (es. caspasi), è stato impiegato un protocollo analogo a quello descritto precedentemente: da 51 pazienti sono state prelevate 33 biopsie da polipi adenomatosi del retto-sigma e 48 biopsie da mucosa sana.

Le biopsie, sono state quindi processate a fresco o poste, anche in questo caso, in terreno RPMI, ma con l'aggiunta del 10% di una soluzione di terreno condizionato per probiotici (preparato in accordo con le procedure descritte in letteratura) oppure, per controllo negativo, del 10% di PBS.

Il tempo d'incubazione delle biopsie è stato allungato a circa 6 ore, allo scopo di valutare l'induzione dell'espressione genica. Questo tempo non è stato prolungato ulteriormente poiché a 12 e 24 ore è stata osservata frequentemente una contaminazione dei campioni e la degradazione dell'RNA.

Infine, dalle biopsie è stato estratto l'RNA totale, che è stato retrotrascritto in cDNA e poi analizzato tramite PCR utilizzando, in questo caso, primer specifici per diverse molecole pro-infiammatorie (α -defensine HD5 e HD6) e pro-apoptotiche (caspasi 3 e 9).

3.3. Estrazione del DNA/RNA

L'estrazione di DNA e di RNA totale dalle biopsie è stata eseguita utilizzando i kit QIAamp mini-DNA e RNeasy miniprep (Qiagen, Valencia, CA) rispettivamente, in accordo con le indicazioni fornite dal produttore.

Prima del suo impiego, l'RNA totale ottenuto mediante estrazione, è stato retrotrascritto in cDNA, utilizzando il kit GeneAmp RNA PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA), come da indicazioni del produttore.

La concentrazione e il grado di purezza degli acidi nucleici estratti sono stati determinati mediante la lettura dei diversi campioni allo spettrofotometro GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ). I campioni sono poi stati portati tutti alla stessa concentrazione.

3.4. Real-time PCR

Le reazioni di Real-time PCR sono state eseguite utilizzando un iCycler iQ Real-Time PCR Detection System, in un volume di 20 μ l, costituito da 16 μ l di SYBR Green PCR Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) e 4 μ l di DNA/RNA.

Per ogni set di primer utilizzato è stato mantenuto il relativo profilo termico consigliato e come normalizzatori dei valori ottenuti nelle reazioni sono stati scelti i geni costitutivi (o housekeeping) GADPH e β -actina: la quantità dei batteri aderenti nei campioni è stata espressa, in modo semi-quantitativo, come percentuale relativa rispetto al valore minore ottenuto nella reazione considerata.

La qualità delle reazioni effettuate è stata valutata mediante il controllo della Melt Curve ed i campioni con Melt Curve anomala rispetto agli standard e/o agli altri campioni sono stati scartati.

Infine, i prodotti di reazione della PCR sono stati fatti migrare su un gel per elettroforesi al 2% di agarosio, con l'aggiunta di bromuro di etidio per poterli visualizzare.

3.5. Statistica

Le comparazioni tra gruppi, per l'adesività batterica e l'espressione delle citochine, sono state eseguite mediante il test del chi quadro o il t di Student per dati appaiati.

La significatività statistica è stata considerata per valori di $p < 0.05$.

L'analisi statistica è stata eseguita tramite il software Med Calc (versione 12.5) per PC.

4. Risultati e conclusioni

4.1. Risultati

Lo scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare e sviluppare un modello “*ex vivo* organ culture” semplice, economico e riproducibile, che possa essere usato nello studio delle interazioni microflora intestinale-ospite, con particolare riferimento all’alterazione del normale equilibrio esistente tra microbiota e meccanismi molecolari proliferativi e/o infiammatori a livello della mucosa colica (Fig. 1).

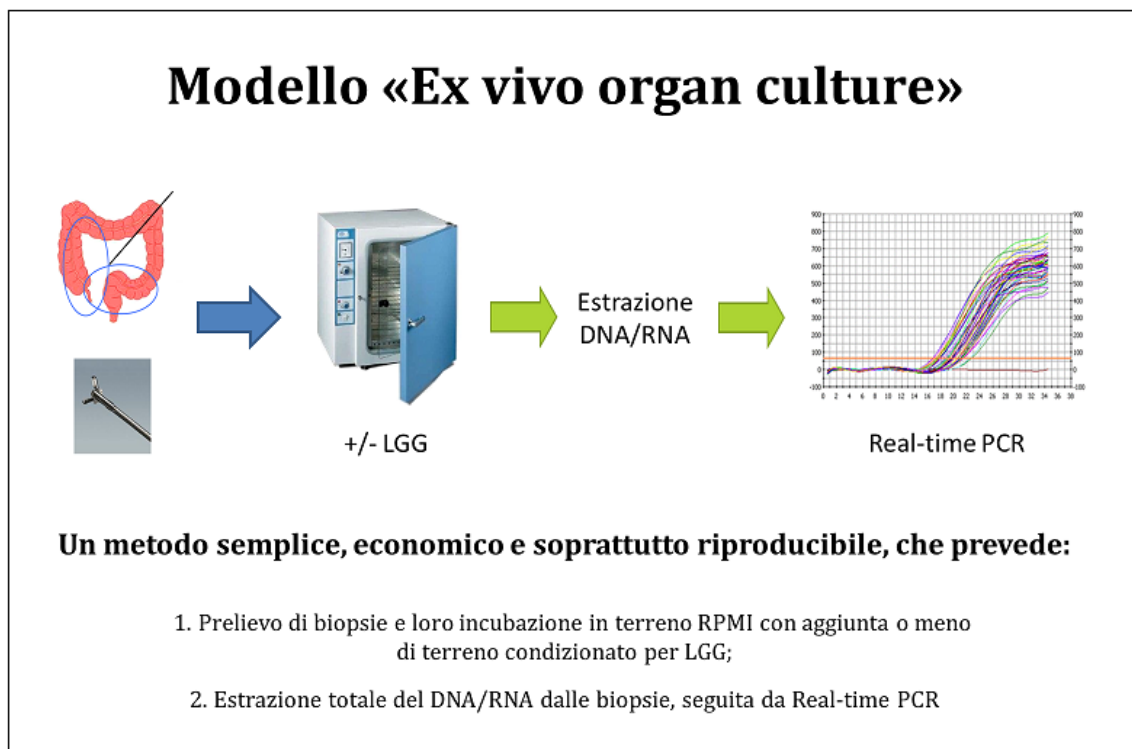


Fig. 1. Rappresentazione schematica del modello presentato nello studio.

La caratterizzazione di questo modello ha previsto lo sviluppo di tre tematiche:

- le alterazioni dei rapporti tra microbiota ed ospite nei polipi adenomatosi, ovvero in una condizione clinica precancerosa comune del tratto gastrointestinale;

- la possibile associazione esistente tra queste alterazioni e i processi infiammatori che avvengono a livello della mucosa intestinale;
- l'eventuale utilizzo terapeutico dei batteri probiotici in questo ambito clinico.

Riguardo alle alterazioni dell'equilibrio microbiota-ospite è stata valutata in primo luogo l'adesività dei principali batteri probiotici ai vari segmenti di mucosa colica sana (distale e prossimale), e ciò che si è potuto notare è che le specie probiotiche aderiscono in modo specifico ai vari segmenti della mucosa del colon (Fig. 2).

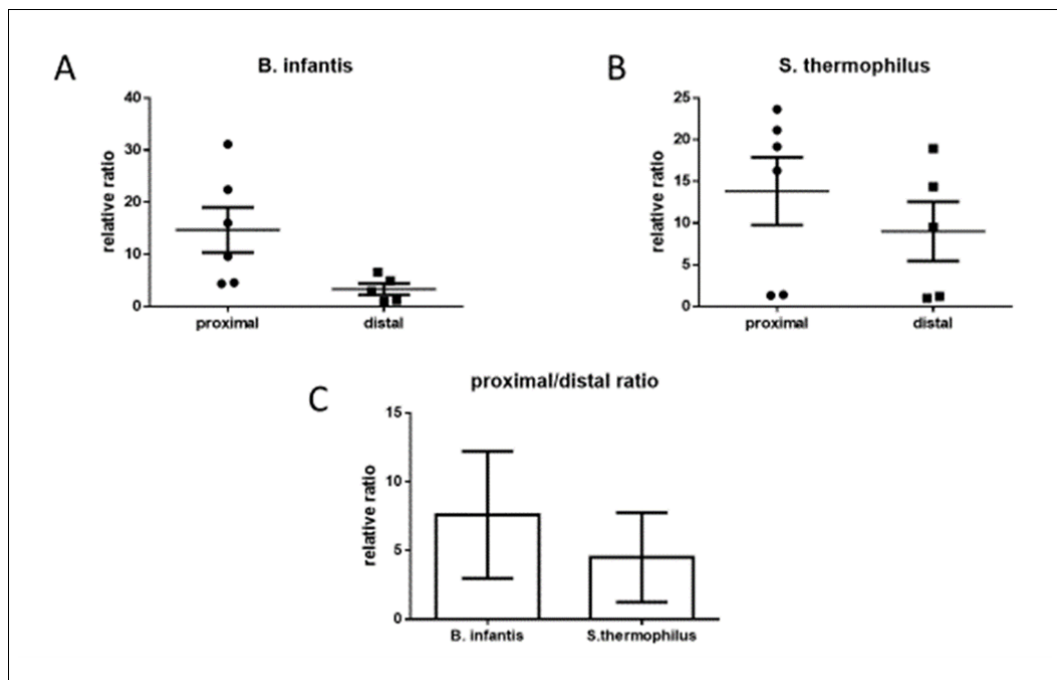


Fig. 2. Adesività relativa dei batteri probiotici ai vari segmenti di mucosa colica sana.

In particolare, incubando i campioni biotici con formulazioni multispecie dei probiotici maggiormente caratterizzati, abbiamo osservato che due delle specie presenti all'interno del composto (ovvero *Bifidobacterium infantis* e *Streptococcus thermophilus*) aderiscono meglio alla mucosa del colon prossimale che a quella del colon distale (Fig. 2).

Un terzo batterio presente nella formulazione, cioè *Lactobacillus acidophilus*, non è stato riscontrato a livello della mucosa, dimostrando la sua incapacità di aderire alla mucosa del colon nelle condizioni utilizzate nell'esperimento (Fig. 2, dato non mostrato).

Successivamente, abbiamo valutato l'adesività di *Lactobacillus rhamnosus LGG*, una delle specie probiotiche maggiormente caratterizzate, osservando come esso tende ad aderire

in modo più marcato (2:1) al colon distale rispetto al prossimale. Tale risultato conferma la precedente osservazione che le diverse specie probiotiche aderiscono ai segmenti sani della mucosa del colon in maniera specifica (Fig. 3).

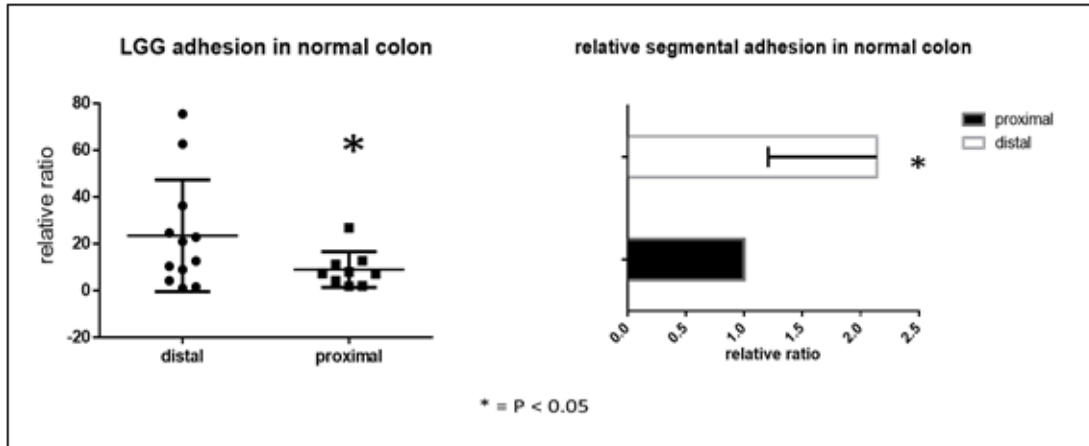


Fig. 3. Adesività relativa del batterio *Lactobacillus rhamnosus* GG ai vari segmenti di mucosa colica sana.

Sulla base dei risultati ottenuti sulla mucosa sana del colon, abbiamo deciso di valutare le possibili differenze di adesività dei batteri probiotici sulla mucosa del colon normale e patologica, con particolare riferimento a quella di polipi adenomatosi: abbiamo raccolto biopsie da entrambi i tipi di mucosa e le abbiamo incubate di nuovo con le formulazioni mono- e multispecie di probiotici impiegate nei test precedenti, osservando sempre una significativa riduzione dell'adesività dei probiotici sulla mucosa da polipo adenomatoso rispetto a quella normale. Nel caso della mucosa patologica, pertanto, le differenti specie batteriche sembrano avere un comportamento simile (Fig. 4).

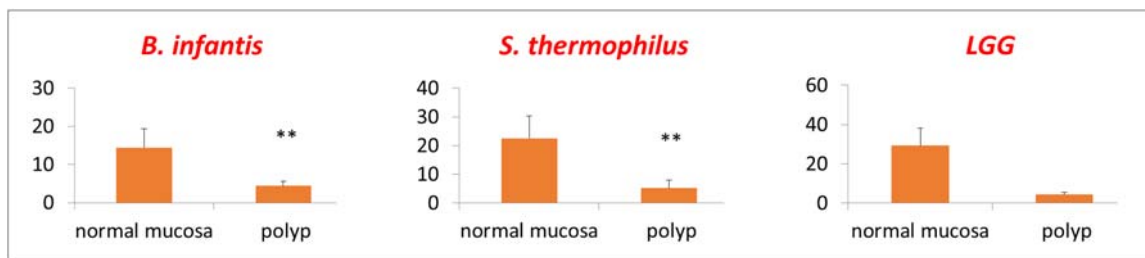


Fig. 4. Confronto nell'adesività batterica sulla mucosa colica sana e da polipo adenomatoso.

Questo risultato è stato quindi confermato in un secondo esperimento *in vivo*, su biopsie raccolte in fase di colonscopia e direttamente processate per l'estrazione del DNA totale

e la sua quantificazione tramite Real-time PCR, con primer specifici per il DNA batterico totale. In effetti, come si evince dalla Figura 5, la capacità di adesione batterica è risultata significativamente più bassa (di ben 20 volte) sulla mucosa del colon patologica rispetto ai controlli da mucosa sana (Fig. 5).

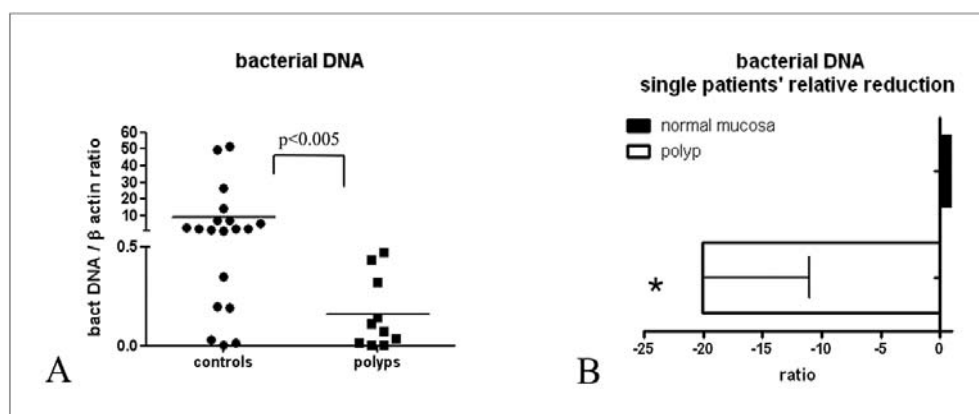


Fig. 5. Confronto nell'adesività batterica sulla mucosa colica sana e da polipo adenomatoso *in vivo*.

Queste differenze di adesività batterica tra la mucosa colica sana e di polipi adenomatosi possono essere spiegate dalla osservazione che nelle biopsie da polipo si ha un aumento della secrezione di alcune molecole anti-batteriche, le α -defensine HD5 e HD6.

Questa tendenza è stata confermata sia tramite l'analisi dei trascritti per le due molecole sia mediante saggio immunostochimico, con il quale è stato possibile visualizzare come le due α -defensine sono scarsamente presenti a livello della mucosa colica sana, mentre sono abbondantemente rappresentate in quella da polipo adenomatoso (Fig. 6).

È opportuno sottolineare che la correlazione tra la diminuzione dell'adesività batterica e l'aumento della secrezione di α -defensine osservate nella mucosa di polipi adenomatosi è puramente teorica, dal momento che non sono stati eseguiti test specifici a riguardo.

L'aumento della secrezione delle molecole pro-infiammatorie che è stato osservato nelle biopsie da polipo adenomatoso ci ha spinto a cercare di comprendere se potesse esserci un'associazione tra le alterazioni riscontrate nei rapporti microbiota-ospite ed i processi infiammatori che avvengono normalmente a livello della mucosa.

A tal proposito, abbiamo voluto esplorare se la pre-incubazione con acido acetilsalicilico (ovvero una molecola anti-infiammatoria) dei campioni biotici, trattati come descritto in precedenza, cioè incubati con formulazioni di *LGG* prima di essere processati, potesse ripristinare l'adesività batterica sulla mucosa dei polipi adenomatosi.

Effettivamente, la pre-incubazione di due ore delle biopsie con acido acetilsalicilico pare ripristinare la capacità di LGG di aderire alla mucosa di polipo, riducendo sensibilmente le differenze di adesività osservate precedentemente e rendendole trascurabili (Fig. 7).

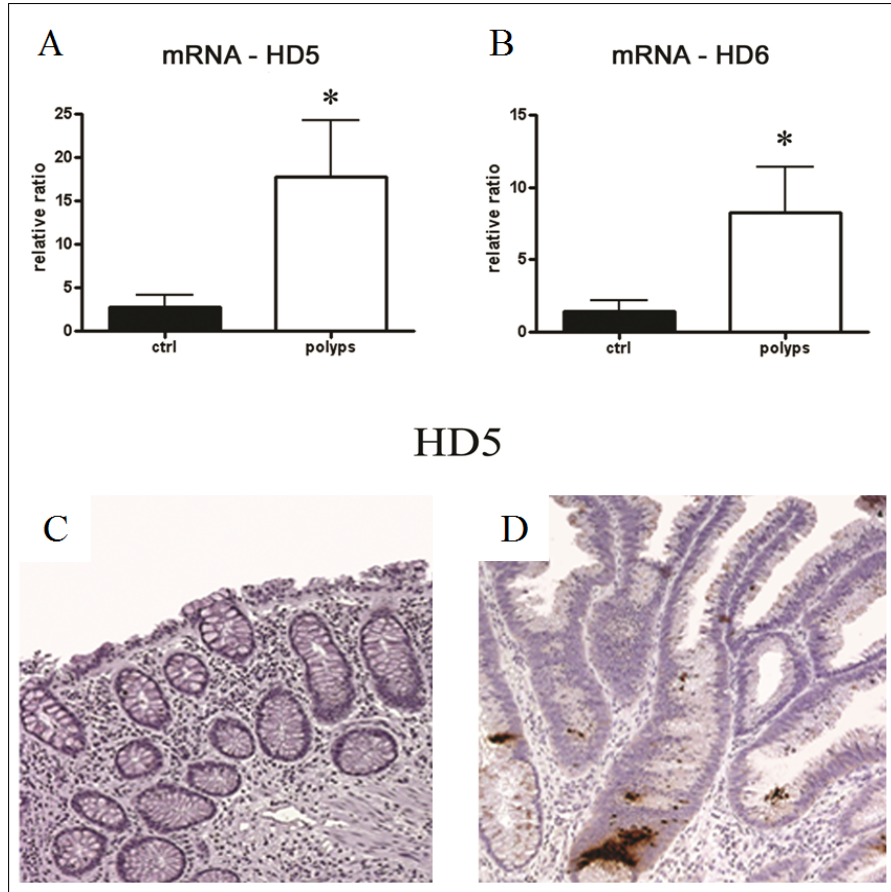


Fig. 6. Aumento della secrezione di α -defensine nella mucosa da polipo adenomatoso rispetto a quella sana, valutata tramite analisi dei trascritti (A e B) e saggio immunocistochimico (C e D).

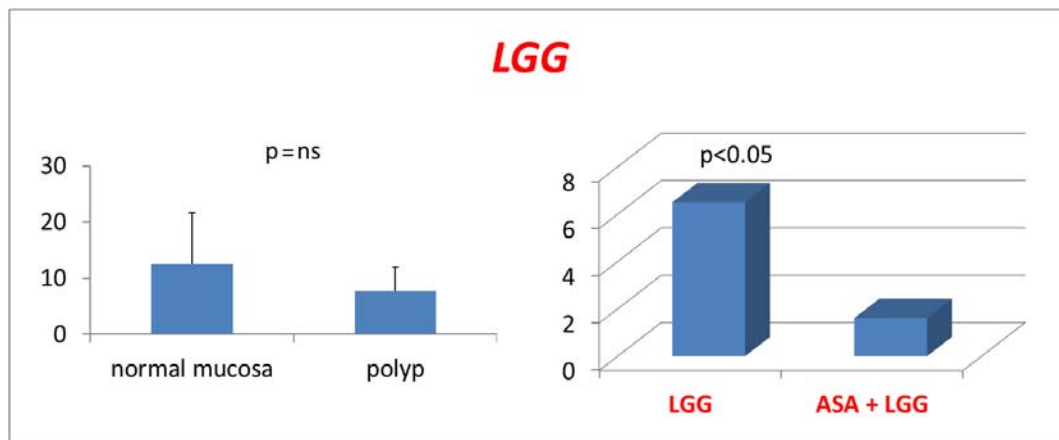


Fig. 7. L'incubazione delle biopsie con acido acetilsalicilico ripristina la capacità di adesione del probiotico LGG alla mucosa dei polipi adenomatosi.

È opportuno sottolineare che quest'ultimo dato, in considerazione del piccolo campione di biopsie utilizzato e della necessità di replicare gli esperimenti effettuati, è da ritenersi preliminare, ma non meno importante ai fini dello studio.

Il terzo ed ultimo scopo del nostro studio è stato quello di valutare un possibile impiego dei batteri probiotici nei processi infiammatori intestinali, in considerazione dei risultati descritti finora. Ci siamo chiesti pertanto se è possibile intervenire su questa disbiosi che si riscontra nella mucosa dei polipi adenomatosi rispetto alla mucosa sana ed applicando il nostro modello sperimentale, abbiamo cercato di capire se le specie probiotiche e nello specifico *Lactobacillus rhamnosus* LGG, possa avere delle caratteristiche tali da renderlo proponibile per questo scopo.

Abbiamo valutato, quindi, il suo possibile effetto anti-infiammatorio su biopsie prelevate da colon distale e prossimale di pazienti con infiammazioni attive (es. colite ulcerosa).

Nelle biopsie, incubate con formulazioni del batterio probiotico, si è registrata una netta riduzione dell'espressione di una importante molecola pro-infiammatoria, cioè il fattore di necrosi tumorale α (TNF α), che è attribuibile a un possibile effetto anti-infiammatorio del batterio probiotico LGG (Fig. 8).

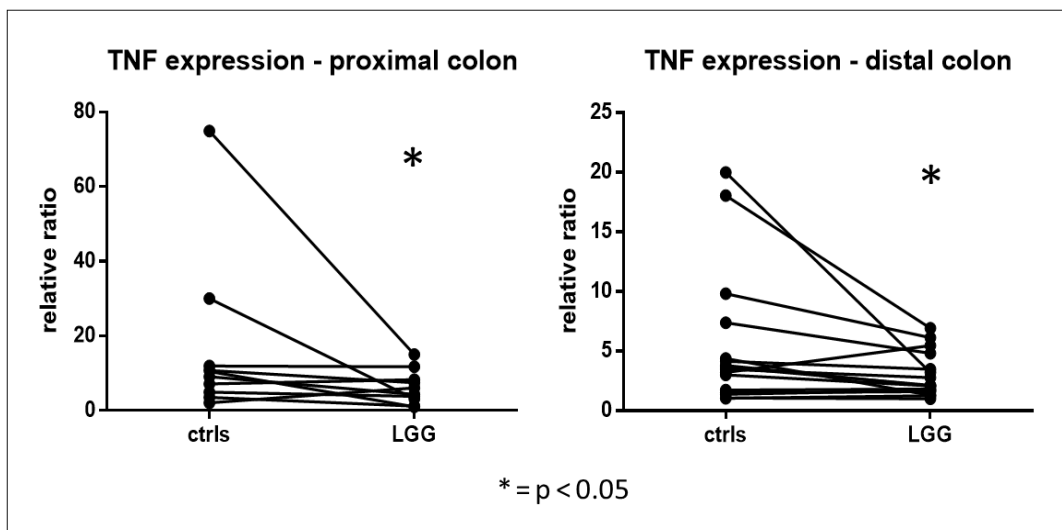


Fig. 8. Effetto anti-infiammatorio del batterio probiotico LGG: riduzione dell'espressione di TNF α nella mucosa colica di pazienti con colite ulcerosa in fase attiva.

Lo stesso effetto di LGG si osserva anche nel caso di un'altra molecola pro-infiammatoria ben caratterizzata, l'interleuchina-17 (IL-17), soprattutto a livello del colon distale, come dimostra la Figura 9. L'effetto appare può moderato, invece, nel colon prossimale.

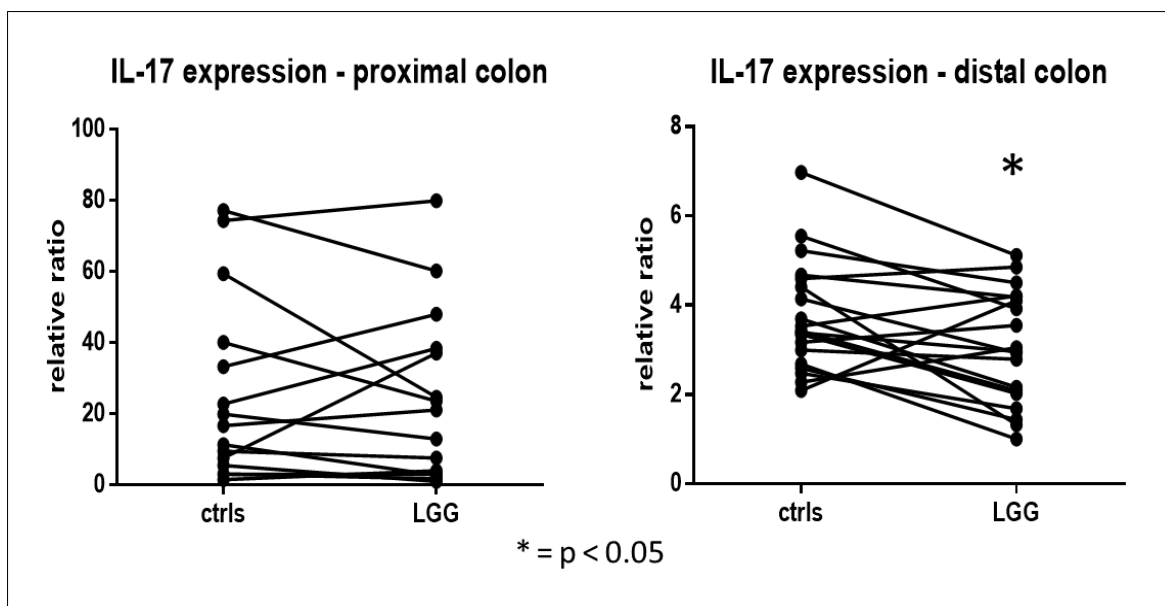


Fig. 9. Effetto anti-infiammatorio del batterio probiotico LGG: riduzione dell'espressione di IL-17 nella mucosa colica di pazienti con colite ulcerosa in fase attiva.

Infine, applicando nuovamente il nostro modello sperimentale *ex vivo*, abbiamo valutato il possibile effetto anti-proliferativo di questo batterio probiotico: a tale scopo, abbiamo incubato biopsie da pazienti con infiammazioni in fase attiva con la stessa formulazione di *LGG* utilizzata nei precedenti esperimenti ed abbiamo osservato, in effetti, un aumento dell'espressione di due molecole importanti nel processo apoptotico, le caspasi 3 e 9, che appare più evidente per la prima (60%) che per la seconda (15%) (Fig. 10 e 11).

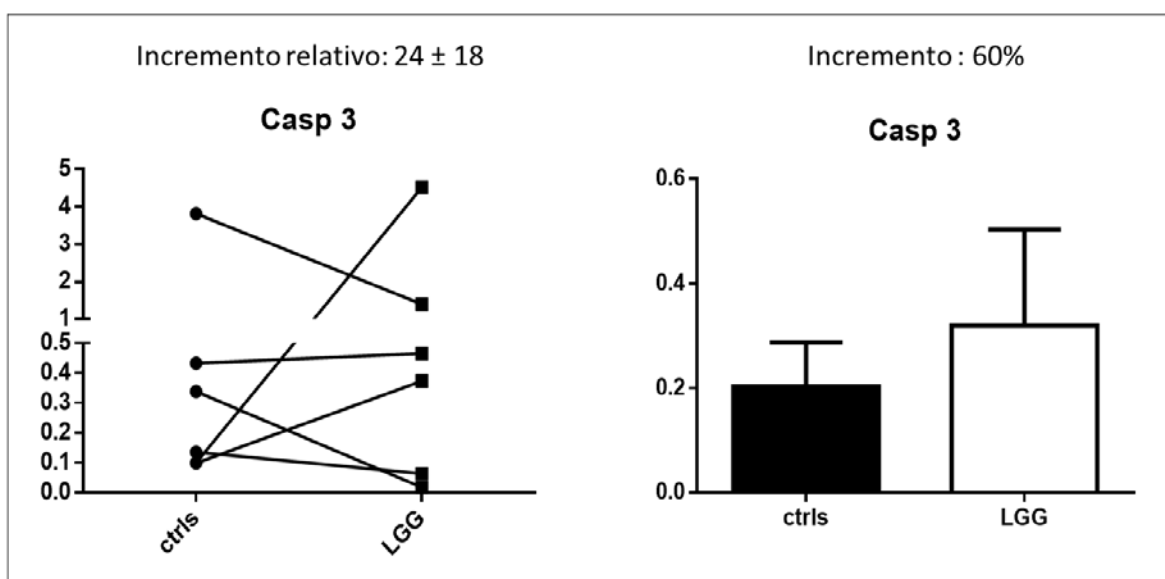


Fig. 10. Effetto anti-proliferativo del batterio probiotico LGG: aumento dell'espressione delle caspasi 3 nella mucosa colica di pazienti con colite ulcerosa in fase attiva.

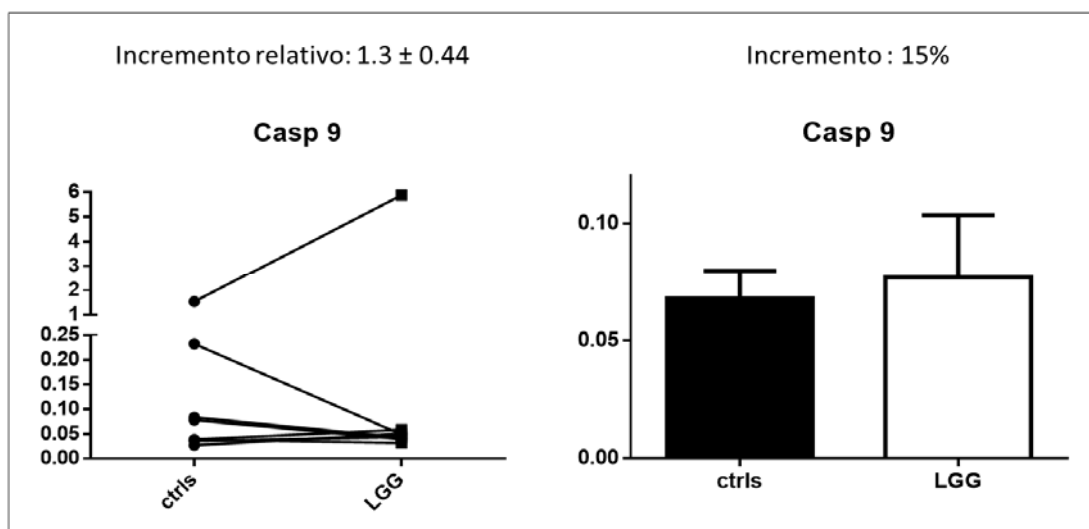


Fig. 11. Effetto anti-proliferativo del batterio probiotico LGG: aumento dell'espressione delle caspasi 9 nella mucosa colica di pazienti con colite ulcerosa in fase attiva.

Riassumendo i risultati ottenuti durante lo studio, si può concludere che i batteri definiti probiotici aderiscono alla mucosa colica normale in maniera specie-specifica.

La mucosa di polipi adenomatosi, invece, produce molecole anti-batteriche, le defensine e mostra nel contempo, una riduzione della capacità di adesione da parte dei batteri.

Questa tendenza può essere invertita mediante l'utilizzo di molecole anti-infiammatorie come l'acido acetilsalicilico, che è in grado di ripristinare l'adesività dei probiotici.

Infine, i batteri probiotici (e in particolare *Lactobacillus rhamnosus* LGG), possono avere un effetto anti-infiammatorio ed anti-proliferativo sulla mucosa del colon, e si candidano per questo ad avere un ruolo nel trattamento degli stati infiammatori intestinali.

4.2. Conclusioni

Da molti anni è noto il ruolo che la microflora batterica intestinale o microbiota, svolge nel mantenimento dell'omeostasi dell'organismo umano, ma solo recentemente, grazie all'utilizzo di tecniche colturali e di biologia molecolare sempre più performanti, si sono registrati progressi notevoli nello studio della microflora endogena. Un rapido sviluppo di così tante metodiche, tuttavia, determina un notevole problema nella interpretazione dei risultati, portando alla necessità di sviluppare modelli di semplice utilizzo.

L'interesse del mondo scientifico è focalizzato sulle interazioni tra microbiota intestinale e ospite, con particolare riguardo alle condizioni fisiologiche e patologiche che possono

causare l'alterazione della composizione e del numero dei batteri presenti nell'intestino dell'uomo. D'altro canto, numerosi studi hanno già suggerito l'utilizzo di batteri provvisti di effetti benefici sulla salute dell'uomo o probiotici, nel trattamento di alcune condizioni patologiche (es. la diarrea infettiva, la sindrome dell'intestino irritabile, IBS e le malattie infiammatorie croniche intestinali, IBD).

A tal proposito, assume una notevole importanza l'approfondimento degli studi sul ruolo del microbiota intestinale nella cancerogenesi della mucosa del colon, dalla formazione dei polipi adenomatosi fino a quella del carcinoma colon-rettale, allo scopo di ridurre l'insorgenza e/o l'incidenza nell'uomo.

La medicina traslazionale, attraverso la continua interazione tra i modelli sperimentali e le condizioni *in vivo* può aiutare i ricercatori a chiarire meglio gli aspetti dell'interazione microbiota-ospite, con particolare riferimento alle relazioni tra il microbiota e i processi infiammatori e neoplastici.

In relazione a queste considerazioni, il nostro studio ha avuto lo scopo di caratterizzare e sviluppare un metodo *ex vivo* semplice, riproducibile ed economico per la valutazione delle interazioni microbiota-ospite. In particolare, l'adesione e gli effetti sulla mucosa dei probiotici possono essere analizzati mediante l'applicazione di questo metodo.

Lo studio è stato incentrato sulle lesioni precancerose, cioè i polipi adenomatosi, poiché questi potrebbero rappresentare un momento chiave del processo neoplastico ed hanno destato, sino a questo momento, minore interesse nei ricercatori rispetto al CCR o a altre forme tumorali, risultando, pertanto, meno caratterizzate.

I risultati di questo studio potranno contribuire ad ampliare la nostra conoscenza sulle complesse interazioni dinamiche tra il microbiota intestinale ed i processi infiammatori e di carcinogenesi colica, con importanti possibili applicazioni, non soltanto puramente conoscitive, ma clinico-pratiche, in termini di diagnosi precoce e di terapia. È auspicabile che la migliore conoscenza delle caratteristiche e delle proprietà del microbiota, e delle possibilità di manipolazione dello stesso, possano portare, in un prossimo futuro, ad una migliore gestione del CCR che rimane, malgrado i progressi riguardo a diagnosi precoce e trattamento, una delle principali cause di mortalità nel mondo occidentale.

5. Bibliografía

1. Kolmeder, C. A. et al. Comparative Metaproteomics and Diversity Analysis of Human Intestinal Microbiota Testifies for Its Temporal Stability and Expression of Core Functions. *PLoS ONE* 7. e29913 (2012).
2. Icaza-Chávez, M. E. Gut microbiota in health and disease. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*. 78, 240–248 (2013).
3. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 90, 859–904 (2010).
4. Ley, R. E., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell*. 124, 837–848 (2006).
5. Peterson, D. A., Frank, D. N., Pace, N. R. & Gordon, J. I. Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host & Microbe*. 3, 417–427 (2008).
6. Guarner, F. et al. Mechanisms of Disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 275–284 (2006).
7. O’Hara, A. M. & Shanahan, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*. 7, 688–693 (2006).
8. Frank, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *PNAS*. 104, 13780–13785 (2007).
9. Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M. & Relman, D. A. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in Ecology & Evolution*. 21, 517–523 (2006).
10. Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A. & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17, 259 (2004).
11. Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H. & Hale, L.-P. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J. Gastroenterol.* 11, 1131–1140 (2005).
12. Neish, A. S. Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology*. 136, 65–80 (2009).

13. Qin, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464, 59–65 (2010).
14. Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. *PNAS*. 95, 6578–6583 (1998).
15. Tap, J. et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*. 11, 2574–2584 (2009).
16. Arumugam, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 473, 174–180 (2011).
17. McConnell, E. L., Fadda, H. M. & Basit, A. W. Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 364, 213–226 (2008).
18. Redondo-Lopez, V., Cook, R. L. & Sobel, J. D. Emerging Role of Lactobacilli in the Control and Maintenance of the Vaginal Bacterial Microflora. *Clin. Infect. Dis.* 12, 856–872 (1990).
19. Mändar, R. & Mikelsaar, M. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol. Neonate* 69, 30–35 (1996).
20. Huurre, A. et al. Mode of Delivery – Effects on Gut Microbiota and Humoral Immunity. *Neonatology*. 93, 236–240 (2008).
21. Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M. & Oyaizu, H. Distribution of Bifidobacterial Species in Human Intestinal Microflora Examined with 16S rRNA-Genetargeted Species-Specific Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4506–4512 (1999).
22. Mackie, R. I., Sghir, A. & Gaskins, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1035s–1045s (1999).
23. Koenig, J. E. et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108, 4578–4585 (2011).
24. Rajilić-Stojanović, M. et al. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental Microbiology*. 11, 1736–1751 (2009).
25. Costello, E. K. et al. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science*. 326, 1694–1697 (2009).
26. Frazier, T. H., DiBaise, J. K. & McClain, C. J. Gut Microbiota, Intestinal Permeability, Obesity-Induced Inflammation, and Liver Injury. *J. Par. Ent. Nutr.* 35, 14S–20S (2011).

27. Macpherson, A. J., Hunziker, L., McCoy, K. & Lamarre, A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes and Infection*. 3, 1021–1035 (2001).
28. Bäckhed, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS*. 101, 15718–15723 (2004).
29. Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *PNAS*. 104, 979–984 (2007).
30. Dronamraju, S. S., Coxhead, J. M., Kelly, S. B. & Mathers, J. C. Differential Antineoplastic Effects of Butyrate in Cells With and Without a Functioning DNA Mismatch Repair. *Nutrition and Cancer*. 62, 105–115 (2009).
31. Scharlau, D. et al. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 682, 39–53 (2009).
32. LeBlanc, J. G. et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*. 24, 160–168 (2013).
33. Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N. & Núñez, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.* 14, 685–690 (2013).
34. Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O. & Kasper, D. L. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell*. 122, 107–118 (2005).
35. Hamada, H. et al. Identification of Multiple Isolated Lymphoid Follicles on the Antimesenteric Wall of the Mouse Small Intestine. *J. Immunol.* 168, 57–64 (2002).
36. Husebye, D. E., Hellström, P. M. & Midtvedt, T. Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Digest. Dis. Sci.* 39, 946–956 (1994).
37. Madsen, D., Beaver, M., Chang, L., Bruckner-Kardoss, E. & Wostmann, B. Analysis of bile acids in conventional and germfree rats. *J. Lipid Res.* 17, 107–111 (1976).
38. Lilly, D. M. & Stillwell, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*. 147, 747–748 (1965).
39. Fuller, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66, 365–378 (1989).
40. Havenaar, R. & Veld, J. H. J. H. I. in *The Lactic Acid Bacteria*. Volume 1 (ed. Wood, B. J. B.) 151–170 (1992).

41. Guarner, F. & Schaafsma, G. J. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 237–238 (1998).
42. Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. & Huis in't Veld, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology.* 41, 85–101 (1998).
43. Fijan, S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International journal of environmental research and public health.* 11, 4745–4767 (2014).
44. Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A. & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews.* 17, 259 (2004).
45. Geier, M. S., Butler, R. N. & Howarth, G. S. Probiotics, prebiotics and synbiotics: A role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biology & Therapy.* 5, 1265–1269 (2006).
46. Peitsidou, K., Karantanos, T. & Theodoropoulos, G. E. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics: Is There Enough Evidence to Support Their Use in Colorectal Cancer Surgery? *Digestive Surgery.* 29, 426–438 (2012).
47. Morson, B. C. Factors influencing the prognosis of early cancer of the rectum. *Proc. R. Soc. Med.* 59, 607–608 (1966).
48. Fenoglio-Preiser, C. M. & Hutter, R. V. P. Colorectal polyps: Pathologic diagnosis and clinical significance. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 35, 322–344 (1985).
49. Fenoglio, C. M. & Pascal, R. R. Colorectal adenomas and cancer: pathologic relationships. *Cancer.* 50, 2601–2608 (1982).
50. Konishi, F. & Morson, B. C. Pathology of colorectal adenomas: a colonoscopic survey. *J. Clin. Pathol.* 35, 830–841 (1982).
51. Correa, P. Epidemiology of polyps and cancer. *Major Probl. Pat.* 10, 126–152 (1978).
52. Williams, A. R., Balasooriya, B. A. & Day, D. W. Polyps and cancer of the large bowel: a necropsy study in Liverpool. *Gut.* 23, 835–842 (1982).
53. Farris, A. B. et al. Sessile Serrated Adenoma: Challenging Discrimination From Other Serrated Colonic Polyps. *The American Journal of Surgical Pathology.* 32, 30–35 (2008).
54. Brenner, H., Kloor, M. & Pox, C. P. Colorectal cancer. *Lancet.* 383, 1490–1502 (2014).
55. Ferlay, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* 127, 2893–2917 (2010).
56. Jemal, A. et al. Global cancer statistics. *CA: A Can. J. for Clin.* 61, 69–90 (2011).

57. Burn, J., Mathers, J. & Bishop, D. T. Genetics, Inheritance and Strategies for Prevention in Populations at High Risk of Colorectal Cancer (CRC) in *Prospects for Chemoprevention of Colorectal Neoplasia*. 157–183 (2013).
58. Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*. 138, 2044–2058 (2010).
59. Lynch, H. T. & de la Chapelle, A. Hereditary Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 348, 919–932 (2003).
60. Chan, D. S. M. et al. Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS ONE*. 6, e20456 (2011).
61. Fedirko, V. et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann. Oncol.* 22, 1958–1972 (2011).
62. Liang, P. S., Chen, T.-Y. & Giovannucci, E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 124, 2406–2415 (2009).
63. Ma, Y. et al. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLoS ONE* 8, e53916 (2013).
64. Jiang, Y. et al. Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur. J. Epidemiol.* 26, 863–876 (2011).
65. Rothwell, P. M. et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 376, 1741–1750 (2010).
66. Bosetti, C., Rosato, V., Gallus, S., Cuzick, J. & Vecchia, C. L. Aspirin and cancer risk: a quantitative review to 2011. *Ann. Oncol.* 23, 1403–1415 (2012).
67. Jass, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113–130 (2007).
68. Vogelstein, B. et al. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine* 319, 525–532 (1988).
69. Lin, J.-K., Chang, S.-C., Yang, Y.-C. & Li, A. F.-Y. Loss of Heterozygosity and DNA Aneuploidy in Colorectal Adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 10, 1086–1094 (2003).
70. Leary, R. J. et al. Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *PNAS* 105, 16224–16229 (2008).

- 71.** Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649 (1998).
- 72.** The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337 (2012).
- 73.** Barbacid, M. Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 779–827 (1987).
- 74.** Fearon, E. R. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6, 479–507 (2011).
- 75.** Swamy, M. V., Herzog, C. R. & Rao, C. V. Inhibition of COX-2 in Colon Cancer Cell Lines by Celecoxib Increases the Nuclear Localization of Active p53. *Cancer Res.* 63, 5239–5242 (2003).
- 76.** Ogino, S. et al. Cyclooxygenase-2 Expression Is an Independent Predictor of Poor Prognosis in Colon Cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 8221–8227 (2008).
- 77.** Sjöblom, T. et al. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* 314, 268–274 (2006).
- 78.** Lanza, G. et al. Immunohistochemical Pattern of MLH1/MSH2 Expression Is Related to Clinical and Pathological Features in Colorectal Adenocarcinomas with Microsatellite Instability. *Mod. Pathol.* 15, 741–749 (2002).
- 79.** Kambara, T. et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 53, 1137–1144 (2004).
- 80.** Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867 (2002).
- 81.** Ma, X.-T. et al. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 10, 1569–1573 (2004).
- 82.** Corvinus, F. M. et al. Persistent STAT3 Activation in Colon Cancer Is Associated with Enhanced Cell Proliferation and Tumor Growth. *Neoplasia* 7, 545–555 (2005).
- 83.** Reddy, B. S. & Rivenson, A. Inhibitory Effect of Bifidobacterium longum on Colon, Mammary, and Liver Carcinogenesis Induced by 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a Food Mutagen. *Cancer Res.* 53, 3914–3918 (1993).
- 84.** Moore, W. E. & Moore, L. H. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3202–3207 (1995).
- 85.** Danese, S. Editorial Inflammatory Bowel Disease and Inflammation-Associated Colon Cancer: Partners in Crime. *Current Drug Targets* 9, 360–360 (2008).
- 86.** Klampfer, L. CYTOKINES, INFLAMMATION AND COLON CANCER. *Curr. Cancer Drug Targets* 11, 451–464 (2011).

- 87.** Erdman, S. E. & Poutahidis, T. Roles for Inflammation and Regulatory T Cells in Colon Cancer. *Toxicol. Pathol.* 38, 76–87 (2010).
- 88.** Mantovani, A., Garlanda, C. & Allavena, P. Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation. *Ann. Med.* 42, 161–170 (2010).
- 89.** Meira, L. B. et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *Journal of Clinical Investigation* (2008).
- 90.** Neufert, C., Becker, C. & Neurath, M. F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat. Protocols* 2, 1998–2004 (2007).
- 91.** Westbrook, A. M., Wei, B., Braun, J. & Schiestl, R. H. Intestinal Mucosal Inflammation Leads to Systemic Genotoxicity in Mice. *Cancer Res.* 69, 4827–4834 (2009).
- 92.** Kojima, M. et al. Increased Nuclear Factor- κ B Activation in Human Colorectal Carcinoma and its Correlation with Tumor Progression. *Anticancer Res.* 24, 675–682 (2004).
- 93.** Karin, M. & Greten, F. R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749–759 (2005).
- 94.** Vannucci et al. Colorectal carcinogenesis in germ-free and conventionally reared rats: Different intestinal environments affect the systemic immunity. *International Journal of Oncology* 32, 609–617 (2008).
- 95.** Kado, S. et al. Intestinal Microflora Are Necessary for Development of Spontaneous Adenocarcinoma of the Large Intestine in T-Cell Receptor β Chain and p53 Double-Knockout Mice. *Cancer Res.* 61, 2395–2398 (2001).
- 96.** Balish, E. & Warner, T. Enterococcus faecalis Induces Inflammatory Bowel Disease in Interleukin-10 Knockout Mice. *The American Journal of Pathology* 160, 2253–2257 (2002).
- 97.** Engle, S. J. et al. Elimination of Colon Cancer in Germ-free Transforming Growth Factor Beta 1-deficient Mice. *Cancer Res.* 62, 6362–6366 (2002).
- 98.** Laqueur, G. L., McDaniel, E. G. & Matsumoto, H. Tumor Induction in Germfree Rats With Methylazoxymethanol (MAM) and Synthetic MAM Acetate. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 39, 355–371 (1967).
- 99.** Kim, D.-H. & Jin, Y.-H. Intestinal bacterial β -glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch. Pharm. Res.* 24, 564–567 (2001).

- 100.** Carman, R. J., Van Tassell, R. L., Kingston, D. G. I., Bashir, M. & Wilkins, T. D. Conversion of IQ, a dietary pyrolysis carcinogen to a direct-acting mutagen by normal intestinal bacteria of humans. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 206, 335–342 (1988).
- 101.** Bashir, M., Kingston, D. G. I., Carman, R. J., van Tassell, R. L. & Wilkins, T. D. Anaerobic metabolism of 2-amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ) by human fecal flora. *Mutation Research Letters* 190, 187–190 (1987).
- 102.** Reddy, B. S. & Rivenson, A. Inhibitory Effect of Bifidobacterium longum on Colon, Mammary, and Liver Carcinogenesis Induced by 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a Food Mutagen. *Cancer Res.* 53, 3914–3918 (1993).
- 103.** Knasmüller, S. et al. Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 480–481, 129–138 (2001).
- 104.** Gorbach, S. L. & Goldin, B. R. The Intestinal Microflora and the Colon Cancer Connection. *Clinical Infectious Diseases* 12, S252–S261 (1990).
- 105.** Povey, A. C., Schiffman, M., Taffe, B. G. & Harris, C. C. Laboratory and epidemiologic studies of fecapentaenes. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 259, 387–397 (1991).
- 106.** Huycke, M. M., Joyce, W. & Wack, M. F. Augmented Production of Extracellular Superoxide by Blood Isolates of *Enterococcus faecalis*. *J. Infect. Dis.* 173, 743–745 (1996).
- 107.** Balamurugan, R., Rajendiran, E., George, S., Samuel, G. V. & Ramakrishna, B. S. Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23, 1298–1303 (2008).
- 108.** Pagnini, Cristiano, Vito D. Corleto, Sharon B. Hoang, Rubina Saeed, Fabio Cominelli, and Gianfranco Delle Fave. “Commensal Bacteria and ‘Oncologic Surveillance’: Suggestions from an Experimental Model.” *Journal of Clinical Gastroenterology* 42: S193–S196 (2008).
- 109.** Chong, E. S. L. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World J. Microb. Biot.* 30, 351–374 (2014).
- 110.** Chang, J.-H., Shim, Y. Y., Cha, S.-K., Reaney, M. J. T. & Chee, K. M. Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFR1342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. *J. Med. Microbiol.* 61, 361–368 (2012).

- 111.** Di Giulio, D.B., Romero, R., Amogan, H.P., Kusanovic, J.P., Bik, E.M., Gotsch, F., et al., Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* 3, e3056 (2008).
- 112.** Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 8–12 (2009).
- 113.** Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., et al., Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr. Microbiol.* 51, 270–274 (2005).
- 114.** Munyaka, P.M., Khafipour, E., Ghia, J.E., External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. *Front. Pediatr.* 2, 109 (2014).
- 115.** Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., et al., Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227 (2012).
- 116.** Professor J. M. T. Hamilton-Miller, G. R. Gibson, W. Bruck, Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic', in *British Journal of Nutrition*, n° 90, p. 845 (2003).
- 117.** Sanders ME, Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health, in *The Journal of Nutrition*, vol. 130, 2S Suppl, pp. 384S–390S (2000).
- 118.** D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ, Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis, in *BMJ*, vol. 324, n° 7350, p. 1361 (2002).
- 119.** Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, et al., Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea, in *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 16, n° 8, agosto (2002).
- 120.** Mcfarland LV., Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease, in *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 101, n° 4, pp. 812–22 (2006).
- 121.** Szajewska H, Mrukowicz J., Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea, in *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 22, n° 5, 1º, pp. 365–72 (2005).
- 122.** Szajewska H, Ruszczyński M, Radzikowski A., Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials, in *J. Pediatr.*, vol. 149, n° 3, pp. 367–372 (2006).

- 123.** Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S, Black RE., Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials, *Lancet Infect. Dis.*, vol. 6, n° 6, pp. 374–82 (2006).
- 124.** B. Yaşar, E. Abut; H. Kayadibi; B. Toros; M. Sezikli; Z. Akkan; Ö. Keskin; O. Övünç Kurdaş, Efficacy of probiotics in Helicobacter pylori eradication therapy., in *Turk. J. Gastroenterol.*, vol. 21, n° 3, pp. 212-7 (2010).
- 125.** P. Marteau, The clinical importance of intestinal microbiota. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 34 Suppl. 1, pp. S93-7 (2010).
- 126.** R. Rastmanesh, High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction., *Chem. Biol. Interact.*, vol. 189, 1-2, pp. 1-8 (2011).
- 127.** Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL, Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer, *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, 2 Suppl., pp. 451S–455S (2001).
- 128.** Brady LJ, Gallaher DD, Busta FF, The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer, in *The Journal of Nutrition*, vol. 130, 2S Suppl., pp. 410S–414S, PMID 10721916 (2000).
- 129.** Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Esteve J, Sant M, Storm H, et al. EURO CARE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Ann. Oncol.*; 14 Suppl. 5 v: 128-49 (2003).
- 130.** McPherson JD. A defining decade in DNA sequencing. *Nat. Methods*. 11(10):1003–1005 (2014).
- 131.** Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE et al. Two routes of metabolic cross feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl. Environ Microbiol.* 72(5):3593–3599 (2006).
- 132.** Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ. Microbiol.* 9(5):1101–1111 (2007).
- 133.** Eller C, Crabill MR, Bryant MP. Anaerobic roll tube media for nonselective enumeration and isolation of bacteria in human feces. *Appl. Microbiol.* 22(4):522–529 (1971).
- 134.** Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(Pt 6):2141–2146 (2002).

- 135.** Lagier JC, Hugon P, Khelaifi a S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 28(1):237–264 (2015).
- 136.** Ferenci T. ‘Growth of bacterial cultures’ 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics. *Res. Micr.* 150(7):431–438 (1999).
- 137.** Miller TL, Wolin MJ. Fermentation by the human large intestine microbial community in an in vitro semi continuous culture system. *Appl. Environ. Microbiol.* 42(3):400–407 (1981).
- 138.** Van den Abbeele P, Grootaert C, Marzorati M, Possemiers S, Verstraete W, Gerard P et al. Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for *Bacteroidetes* and *Clostridium cluster IX*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(15):5237–5246 (2010).
- 139.** Klaasen HL, Koopman JP, Van den Brink ME, Van Wezel HP, Beynen AC. Mono-association of mice with non-cultivable, intestinal, segmented, filamentous bacteria. *Arch. Microbiol.* 156(2):148–151 (1991).
- 140.** Kostic AD, Howitt MR, Garrett WS. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes Dev.* 27(7):701–718 (2013).
- 141.** Ericsson AC, Davis JW, Spollen W, Bivens N, Givan S, Hagan CE et al. Effects of vendor and genetic background on the composition of the fecal microbiota of inbred mice. *PLoS One* 10 (2), e0116704 (2015).
- 142.** Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Mol. Cell* 58(4):586–597 (2015).
- 143.** Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486(7402):207–214 (2012a).
- 144.** Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(11):5088–5090 (1977).
- 145.** Vetrovsky T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One* 8, e57923 (2013).
- 146.** Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and webbased tools. *Nucleic Acids Res.* 41:D590–D596.

- 147.** Reichardt N, Duncan SH, Young P, Belenguer A, McWilliam Leitch C, Scott KP et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J.* 8(6):1323–1335 (2014).
- 148.** Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR et al. Whole genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269(5223):496–512 (1995).
- 149.** Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24:104–108 (1992).
- 150.** Loman NJ, Constantinidou C, Chan JZ, Halachev M, Sergeant M, Penn CW et al. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(9):599–606 (2012).
- 151.** Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5728):1635–1638 (2009).
- 152.** Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312(5778):1355–1359 (2006).
- 153.** Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD et al. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 21(10):1616–1625 (2011).
- 154.** Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(5):339–348 (2008).
- 155.** Raghunathan A, Ferguson HR Jr, Bornarth CJ, Song W, Driscoll M, Lasken RS. Genomic DNA amplification from a single bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(6):3342–3347 (2005).
- 156.** Marcy Y, Ouverney C, Bik EM, Losekann T, Ivanova N, Martin HG et al. Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(29):11889–11894 (2007).
- 157.** Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499(7459):431–437 (2013).

- 158.** Giannoukos G, Ciulla DM, Huang K, Haas BJ, Izard J, Levin JZ et al. Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. *Genome Biol.* 13(3): R23 (2012).
- 159.** Reck M, Tomasch J, Deng Z, Jarek M, Husemann P, Wagner-Dobler I et al. Stool metatranscriptomics: a technical guideline for mRNA stabilization and isolation. *BMC Genomics* 16:494 (2015).
- 160.** Paliy O, Agans R. Application of phylogenetic microarrays to interrogation of human microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79(1):2–11 (2012).
- 161.** Loy A, Pester M, Steger D. Phylogenetic microarrays for cultivation-independent identification and metabolic characterization of microorganisms in complex samples. *Methods Mol. Biol.* 688:187–206 (2010).
- 162.** Tottey W, Denonfoux J, Jaziri F, Parisot N, Missaoui M, Hill D et al. The human gut chip “HuGChip”, an explorative phylogenetic microarray for determining gut microbiome diversity at family level. *PLoS One* 8 (5), e62544 (2013).
- 163.** Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, Huse SM, Montijn RC, Keijser BJ. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med. Genet.* 4:22 (2011).
- 164.** Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br. J. Nutr.* 101(4):541–550 (2009).
- 165.** Amann R, Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24(5):555–565 (2000).
- 166.** Harmsen HJ, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6):2982–2990 (2002).
- 167.** Wilmes P, Bond PL. Microbial community proteomics: elucidating the catalysts and metabolic mechanisms that drive the Earth’s biogeochemical cycles. *Curr. Opin. Microbiol.* 12(3):310–317 (2009).
- 168.** Hettich RL, Sharma R, Chourey K, Giannone RJ. Microbial metaproteomics: identifying the repertoire of proteins that microorganisms use to compete and cooperate in complex environmental communities. *Curr. Opin. Microbiol.* 15(3):373–380 (2012).

- 169.** Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z et al. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin. proteomics* 11(1):16 (2014).
- 170.** Cain JA, Solis N, Cordwell SJ. Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J. Proteome.* 97:265–286 (2014).
- 171.** Kolmeder CA, De Vos WM. Metaproteomics of our microbiome – developing insight in function and activity in man and model systems. *J. Proteome.* 97:3–16 (2014).
- 172.** Verberkmoes NC, Russell AL, Shah M, Godzik A, Rosenquist M, Halfvarson J, et al. Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *ISME J.* 3(2):179–189 (2009).
- 173.** Ursell LK, Haiser HJ, Van Treuren W, Garg N, Reddivari L, Vanamala J, et al. The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. *Gastroenterology.* 146(6):1470–1476 (2014).
- 174.** Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: metabonomics. *Nature.* 455(7216):1054–1056 (2008).
- 175.** Savorani F, Rasmussen MA, Mikkelsen MS, Engelsen SB. A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Res. Int.* 54(1):1131–1145 (2013).
- 176.** Abram F. Systems-based approaches to unravel multi-species microbial community functioning. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13:24–32 (2015).
- 177.** Goedert JJ, Sampson JN, Moore SC, Xiao Q, Xiong X, Hayes RB et al. Fecal metabolomics: assay performance and association with colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 35(9):2089–2096 (2014).
- 178.** Kovatcheva-Datchary P, Egert M, Maathuis A, Rajilic-Stojanovic M, de Graaf AA, Smidt H, et al. Linking phylogenetic identities of bacteria to starch fermentation in an *in vitro* model of the large intestine by RNA-based stable isotope probing. *Environ. Microbiol.* 11(4):914–926 (2009).
- 179.** Uhlik O, Leewis MC, Strejcek M, Musilova L, Mackova M, Leigh MB, et al. Stable isotope probing in the metagenomics era: a bridge towards improved bioremediation. *Biotechnol. Adv.* 31(2):154–165 (2013).