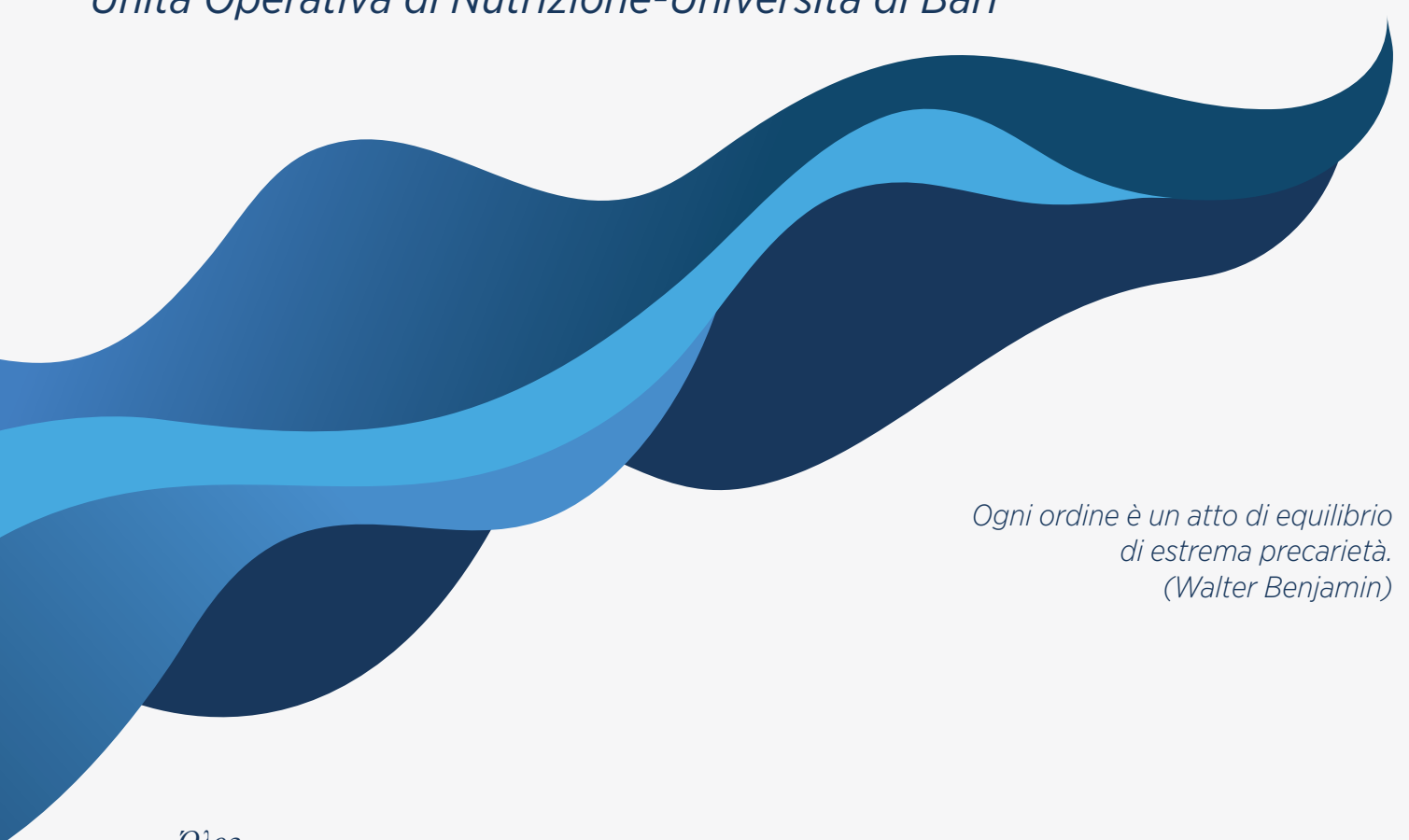


L'ORGANO FRAGILE

Vito Leonardo Miniello, Lucia Diaferio
Unità Operativa di Nutrizione-Università di Bari



Ogni ordine è un atto di equilibrio
di estrema precarietà.
(Walter Benjamin)

Ὅλος

Nel corso dei secoli si è passati da un antico concetto olistico della malattia, spesso intriso di superstizione ('punizione divina') e magia, all'attuale iter diagnostico articolato con il doveroso assemblaggio di sintomi e dei relativi parametri (strumentali, laboratoristici, *imaging*). Questo comporta un inconfutabile progresso, nonostante talvolta rimanga sconosciuto il background eziopatogenetico.

Fattori e noxae ambientali (epigenetici) incidono sensibilmente su rischio e progressione della malattia, alterando le performance dei sistemi biologici e inficiando la capacità dei relativi meccanismi adattativi.

Negli ultimi due decenni si è sviluppata rapidamente la biologia dei *sistemi complessi*¹, una disciplina che indaga su proprietà collettive che non possono essere predette dall'analisi del singolo componente, ma solo dallo studio dell'insieme e da un approccio multidisciplinare.

Un sistema è costituito da componenti ben definiti che, quando integrati, interagiscono per formare una entità funzionale.

Il corpo umano è un complesso multisistema regolato da genetica, alimentazione, ambiente, relazioni interpersonali, cultura e attività. La versione olistica (dal greco ὅλος, totalità) considera il nostro organismo nella sua completezza (corpo, mente e spirito) e non un insieme di organi ed apparati. A tal proposito risulta di estrema attualità l'ammonimento di Platone: *"Non muovere mai l'anima senza il corpo, né il corpo senza l'anima, affinché difendendosi reciprocamente, queste due parti mantengano il loro equilibrio e la salute."*

L'unità funzionale di un organismo è la cellula. Ma è la concertazione che determina l'armonia. La comunicazione intercellulare, mediata attraverso il contatto diretto cellula-cellula o il trasferimento di molecole secrete è necessaria per mantenere le funzioni cellulari e l'omeostasi di organi e apparati. In tale ambito riveste estrema valenza il ruolo del cosiddetto *"traffico vescicolare"*².

Nel 2013 fu assegnato il premio Nobel per la Fisiologia o Medicina agli statunitensi James Rothman e Randy Schekman e al tedesco Thomas Südhof per aver scoperto il meccanismo che regola il trasporto di mo-

lecole tra cellule (“for their discoveries of machinery regulating vesicle traffic, a major transport system in our cells”), un sofisticato sistema di trasporto e distribuzione del proprio carico mediato da *vescicole extracellulari* (EV), deputate alla comunicazione intercellulare³. Le EV, secrete attivamente nei fluidi corporei (sangue, latte materno, saliva, sperma), raggiungono le cellule bersaglio e consegnano il contenuto (DNA, RNA, proteine, enzimi, lipidi), con valenza di messaggi per la regolazione epigenetica. La loro membrana a doppio strato presenta recettori che garantiscono la specificità del traffico, assicurando al tempo stesso che le molecole trasportate arrivino a destinazione senza errori (in condizioni fisiologiche), benché il traffico vescicolare e soprattutto il loro contenuto (in particolare i micro RNA non codificanti) siano coinvolte in numerose patologie (neoplasie e malattie croniche non trasmissibili)⁴. In questa area di ricerca in enorme espansione il termine ‘vescicole extracellulari’ comprende esosomi (20-200 nm), microvescicole (100–1000 nm) e corpi apoptotici⁵.

La pluralità di nicchie ecologiche microbiche presenti nel tratto gastro-intestinale rappresenta l’esempio paradigmatico di un dinamico sistema complesso, interconnesso con l’organismo ospite a livello cellulare, metabolico, immunitario, nervoso, comportamentale ed emozionale. Un sofisticato network regolato da vulnerabili equilibri interni ed esterni.

Homo bacteriens

Attraverso il parto vaginale avviene un vantaggioso ‘passaggio di consegne’ dalla madre al neonato (eredità microbica). Durante e immediatamente dopo il parto, difatti, un numero esorbitante di microrganismi materni e/o ambientali colonizza superfici e cavità comunicanti direttamente o indirettamente con l’esterno: cute, cavità orale, vie aeree, tratto urogenitale e soprattutto il canale alimentare.

In seguito al processo di colonizzazione post-natale vengono a costituirsi specifici ecosistemi microbici autoctoni, noti con il termine di *microbiota*⁶. Dato che il *non self*, rappresentato dalla moltitudine di microrganismi procarioti (batteri, virus, lieviti, *archaea*, batteriofagi) diventa parte integrante dell’ospite (*self*), il corpo umano viene legittimamente considerato un *olobionte* (“superorganismo”) formato dalle proprie cellule eucariote e dai vari microbiota⁷. Il termine *homo bacteriens*, coniato da Henderson e Wilson, rende più di altri il concetto di reciproco mutualismo⁸. Per *ologenoma* si intende l’insieme del genoma umano e quello collettivo dei microrganismi che lo popolano (*microbioma*)⁹.

Tradizionalmente, le comunità microbiche del corpo umano sono state caratterizzate attraverso la coltura su piastre selettive. Tuttavia, tale approccio mostra bassa sensibilità e non consente di esplorare la frazione non coltivabile del microbioma che può rappresentare tra il 60% e l’80% dei batteri. Sulla base di un recente studio metagenomico, condotto su larga scala su microbioma di diversi siti corporei in individui con stili di vita occidentali e non, la diversità del microbioma umano è stata stimata in 25 *phyla*, circa 2.000 generi, 5.000 specie e 316 milioni di geni¹⁰.

Sino a pochi anni fa si riteneva che lo sviluppo del feto avvenisse all’interno di un utero sterile (‘sterile womb’)¹¹. Un dogma recentemente infranto dal riscontro di numerose specie microbiche nel cordone ombelicale¹², placenta, liquido amniotico¹³ e membrane fetali¹⁴, in gravidanze apparentemente senza alcun segno di infiammazione o patologia.

Il profilo del microbiota placentare, composto da *Firmicutes*, *Proteobatteri*, *Tenericutes*, *Bacteroidetes* e *Fusobateri*, presenta similitudini con il microbiota orale¹⁵. Inoltre, il meconio dei neonati a termine ospita 30 generi normalmente presenti nel liquido amniotico, vagina e cavità orale. Si ipotizza che i batteri raggiungano tali siti principalmente dalla vagina, sebbene non si possa escludere la traslocazione selettiva. Il riscontro di *archaea* nel microbiota vaginale di donne gravide presuppone una verosimile trasmissione materno-neonatale.

Le differenti comunità microbiche presenti nei vari distretti non sterili dell’organismo (microbiota intestinale, oro-faringeo, nasale, polmonare, cutaneo, uro-genitale) comunicano con il sistema immunitario e indirettamente tra loro, attraverso metaboliti e citochine (*cross-talk*)¹⁶⁻¹⁷..

Il **microbiota intestinale** è composto da microrganismi simbiotici (commensali) e patobionti (potenzialmente dannosi), il cui equilibrio (omeostasi) risulta cruciale nella modulazione delle varie funzioni e nel determinismo di numerose patologie¹⁸..

Sebbene siano stati descritti più *phyla* batterici, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* rappresentano oltre il 90% della popolazione microbica intestinale¹⁹.

Le comunità batteriche strettamente adese alla mucosa sono tassonomicamente differenti da quelle

presenti nelle feci. I batteri autoctoni (prevalentemente anaerobi) si organizzano in nicchie ecologiche prospicienti la porzione apicale del monostrato epiteliale e nel gel mucoso che lo riveste, mentre quelli transitori (*alloctoni*) occupano il lume insieme a particelle di alimenti non digeriti, quali componenti del flusso fecale. Pertanto, lo studio del solo microbiota fecale esclude gran parte dei batteri autoctoni.

Recentemente è emerso che alcuni commensali (*Alcaligenes*) sono opportunisticamente allocati in siti sensibili quali le placche di Peyer che raggiungono attraverso cellule di campionamento antigenico (cellule M). Un condominio con elementi immunocompetenti decisamente vantaggioso: i lipopolisaccaridi batterici (LPS) inducono da parte delle cellule dendritiche il rilascio di interleuchina (IL)-6 e di citochine immunoregatorie quali interleuchina (IL)-10 e *transforming growth factor-β* (TGF-β), stimolano i linfociti B, incrementando la produzione di IgA e la ricombinazione dello switch IgA²⁰⁻²². Legandosi ai *toll-like receptor* (TLR)-4, gli *Alcaligenes* garantiscono un basso livello di flogosi, sensibilmente inferiore a quello indotto dai LPS di *Escherichia coli* e pertanto una rassicurante tolleranza²³.

Ogni individuo è connotato da un personale ‘profilo batterico’, nonostante la presenza di un *core* comune a tutti i soggetti destinato alle attività trofico-metaboliche basali (“stabilità di funzione”)²⁴. La composizione del microbiota si modifica in condizioni fisiologiche (regime alimentare, habitat, parto cesareo) e patologiche (antibiotico-terapia, radiazioni, obesità, malattie, stress fisico e psichico.).



In gut we trust

Una delle grandi sfide della ricerca scientifica è comprendere cosa sia un microbioma ‘sano’ (eubiotico). Secondo Rob Knight “*the definition of a healthy gut microbiome may be context-dependent and highly personalized (e.g., for particular age ranges, populations, etc.). As a result, we can’t define what a healthy microbiome is based on whether specific organisms are present*”. Difatti, è normale riscontrare batteri considerati patogeni (*Clostridium difficile*) in individui sani.

Un microbiota *healthy* potrebbe essere definito dalla stabilità ecologica (capacità di resistere a cambiamenti della comunità microbica sotto stress o di ripristinarne la composizione), dalla presenza di specifici pattern batterici (verosimilmente associati alla salute) o da vantaggiosi profili funzionali dell’ospite indotti dai microrganismi (trofici, metabolici, immunitari, ecc.)²⁵.

Benché a tutt’oggi non vi siano specifici parametri compositivi per connotare un microbiota intestinale fisiologico, quello di un lattante sano, nato a termine da parto naturale ed esclusivamente allattato al seno, rappresenta il gold standard post-natale (*eubiosi*).

In tutte le popolazioni le variazioni interindividuali del microbiota risultano essere maggiori nel bambino rispetto all’adulto, mentre le aree geografiche comportano variazioni evidenti in tutte le età²⁶⁻²⁸.

Il genoma collettivo dei microrganismi intestinali (microbioma) contiene innumerevoli informazioni codificate, non sviluppate dall'uomo nel corso della sua evoluzione. Grazie alla produzione di metaboliti e alla presenza di composti strutturali il microbiota intestinale viene legittimamente considerato un organo ad elevata funzione metabolica e immunitaria.

A differenza degli esseri umani, che producono circa 17 enzimi gastrointestinali, l'ecosistema microbico intestinale produce centinaia di enzimi complementari con diverse specificità, consentendo loro di depolimerizzare e fermentare i polisaccaridi alimentari in acidi grassi a catena corta (SCFA), disponibili per l'ospite. Il patrimonio metabolico codificato dal microbioma estende la flessibilità biochimica del nostro organismo elaborando una vasta gamma di substrati in grado di favorire la maturazione post-natale e, in ultima analisi, l'omeostasi immunitaria e metabolica²⁹⁻³⁰. Si ritiene che tale prerogativa sia l'esito della pressione evolutiva che ha portato i batteri a diventare simbionti umani.

Componenti microbici (DNA, acido lipoteicoico, lipopolisaccaridi, PAMPS-*Pathogen Associated Molecular Patterns*) e metaboliti batterici (acidi grassi a catena corta, indolo) regolano sofisticati meccanismi tollerogeni attraverso effetti non immunitari (integrità della barriera epiteliale, produzione di muco, permeabilità intestinale) e immunitari (produzione di citochine e chemiochine anti-infiammatorie, induzione di cellule dendritiche tollerogeniche, differenziazione e proliferazione di linfociti T regolatori, inibizione di risposte T helper 2, incrementata produzione di IgA secretorie)³¹.

Una mole di evidenze scientifiche attribuisce al microbiota intestinale il ruolo di 'organo batterico', con vantaggiose funzioni locali e sistemiche³²⁻³³ (Tab. 1).

Tabella 1. Funzioni del microbiota intestinale.

| | |
|--------------------|--|
| PROTETTIVA | <ul style="list-style-type: none"> - Contrasto alla colonizzazione e traslocazione di microrganismi patogeni e patobionti (produzione sostanze antimicrobiche, competizione per nutrienti e siti recettoriali) - Sintesi di enzimi capaci di trasformare e neutralizzare sostanze xenobiotiche (farmaci e in particolare antibiotici, contaminanti naturali e ambientali, composti largamente utilizzati in agricoltura e zootecnia) - Attivazione della immunità innata e adattativa - Produzione di citochine anti-infiammatorie |
| TROFICA | <ul style="list-style-type: none"> - Degradazione dei composti alimentari - Produzione di vitamine (gruppo B, vit. K, biotina, acido folico) - Biosintesi di aminoacidi - Biotrasformazione degli acidi biliari - Regolazione dei depositi di grasso - Assorbimento di acqua e minerali (Fe⁺⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺) - Promozione dell'angiogenesi |
| METABOLICA | <ul style="list-style-type: none"> - Produzione di composti a funzione trofica per l'enterocita (acidi grassi a catena corta, aminoacidi, poliamine, fattori di crescita) |
| STRUTTURALE | <ul style="list-style-type: none"> - Differenziazione e crescita delle cellule epiteliali - Recupero energetico - Fermentazione dei substrati non digeribili e del muco - Sviluppo di cripte e villi intestinali - Consolidamento della funzione di barriera mucosale - Modulazione della densità di massa ossea - Ottimizzazione delle performance neurocognitive - Modulazione dell'umore |

Oltre a scomporre sostanze alimentari altrimenti indigeribili, modulare il sistema immunitario, produrre micronutrienti e metaboliti, il microbiota intestinale influenza l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene³⁴ e produce sostanze neurologicamente attive come acido gamma-aminobutirrico (GABA)³⁵, dopamina, norepinefrina, serotonina³⁶⁻³⁷.

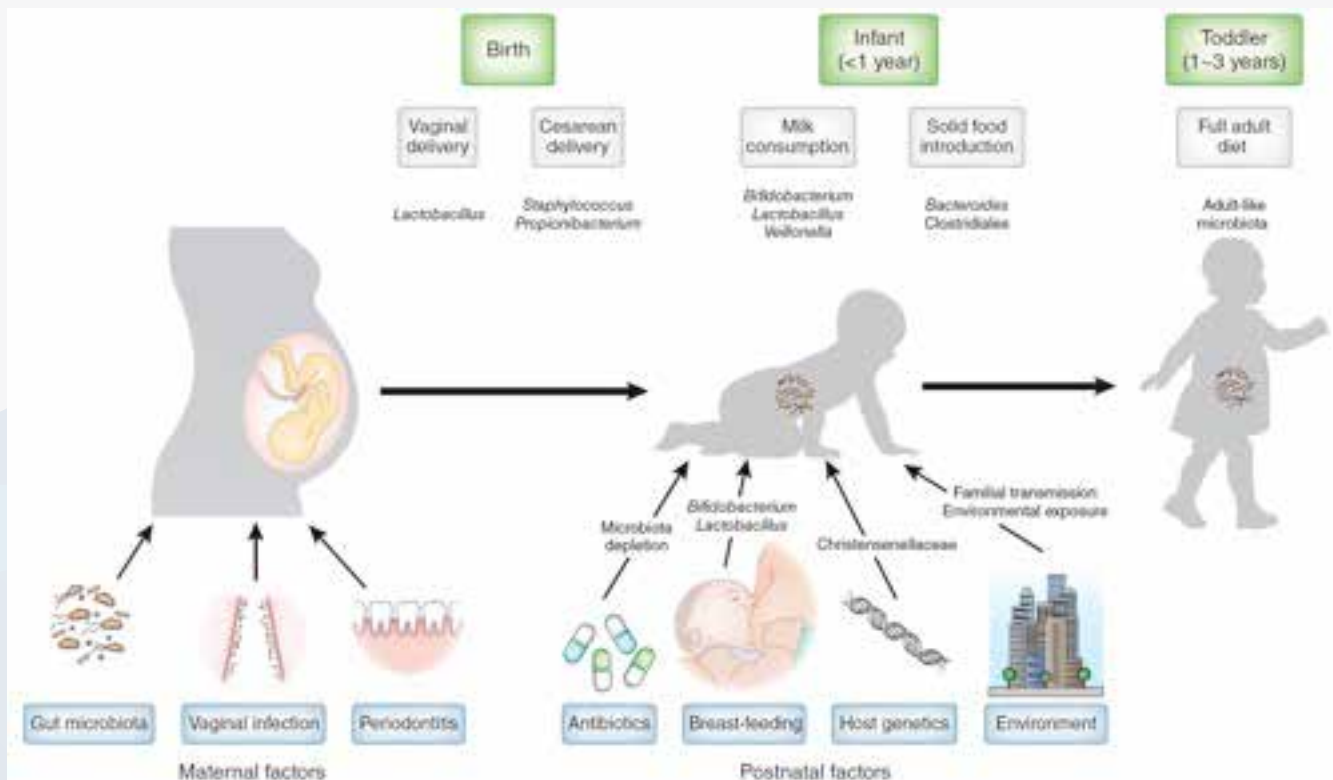
Alterazioni compositive del microbioma intestinale sono state associate a disturbi dell'umore, incluso il disturbo depressivo maggiore³⁸. Tale alterazione deriva dall'asse intestino-cervello, sistema di comunicazione bidirezionale mediato da vie neuroimmuni, neuroendocrini e sensoriali.

Lo stile di vita e soprattutto la dieta influiscono sulla diversità del microbioma intestinale umano. **È stato ampiamente dimostrato che una *western diet*** (ricca di carboidrati raffinati, grassi, carni rosse e povera di vegetali, frutta e pesce) ha effetti su sistema immunitario e composizione del microbiota. I dati raccolti dall'*American Gut Project* (parte del *Microsetta Initiative*)³⁹ mostrano sensibili differenze compositive microbiche (maggiori di quelle indotte da terapia antibiotica) tra individui che assumono solo alcune tipologie di vegetali a settimana e quelli che ne consumano oltre 30 varietà.

Vulnerabilità d'organo

Nelle prime epoche della vita la composizione quali-quantitativa del microbiota è sensibilmente condizionata da numerosi fattori⁴⁰⁻⁴¹:

- background genetico dell'organismo ospite;
- distribuzione geografica;
- costituzione atopica;
- indice di massa corporea e incremento ponderale materno durante la gravidanza;
- infezioni della madre in gravidanza (periodontite materna da *Porphyromonas gingivalis*);
- età gestazionale;
- antibioticoterapia in epoca perinatale;
- modalità del parto (vaginale o cesareo);
- sede del parto (nosocomiale o domiciliare);
- pattern degli oligosaccaridi del latte materno (presenza o meno di un *status secretor* e/o Lewis);
- modalità di allattamento al seno: diretto al capezzolo o indiretto (tiralatte)
- alimentazione (allattamento materno, artificiale o misto, composizione e *timing* dell'alimentazione complementare);
- tasso di supplementazione di ferro nel latte formula;
- fortificazione marziale (integratori);
- regime dietetico;
- varietà dei vegetali assunti;
- *pet keeping*.



Nonostante gli inconfutabili progressi realizzati nello scandagliare l'universo microbico intestinale, restano zone d'ombra sui fattori che modulano le variazioni compositive e funzionali del microbiota, nell'ambito della specie umana e tra differenti specie. Il background genetico e la dieta sono indicati come principali driver.

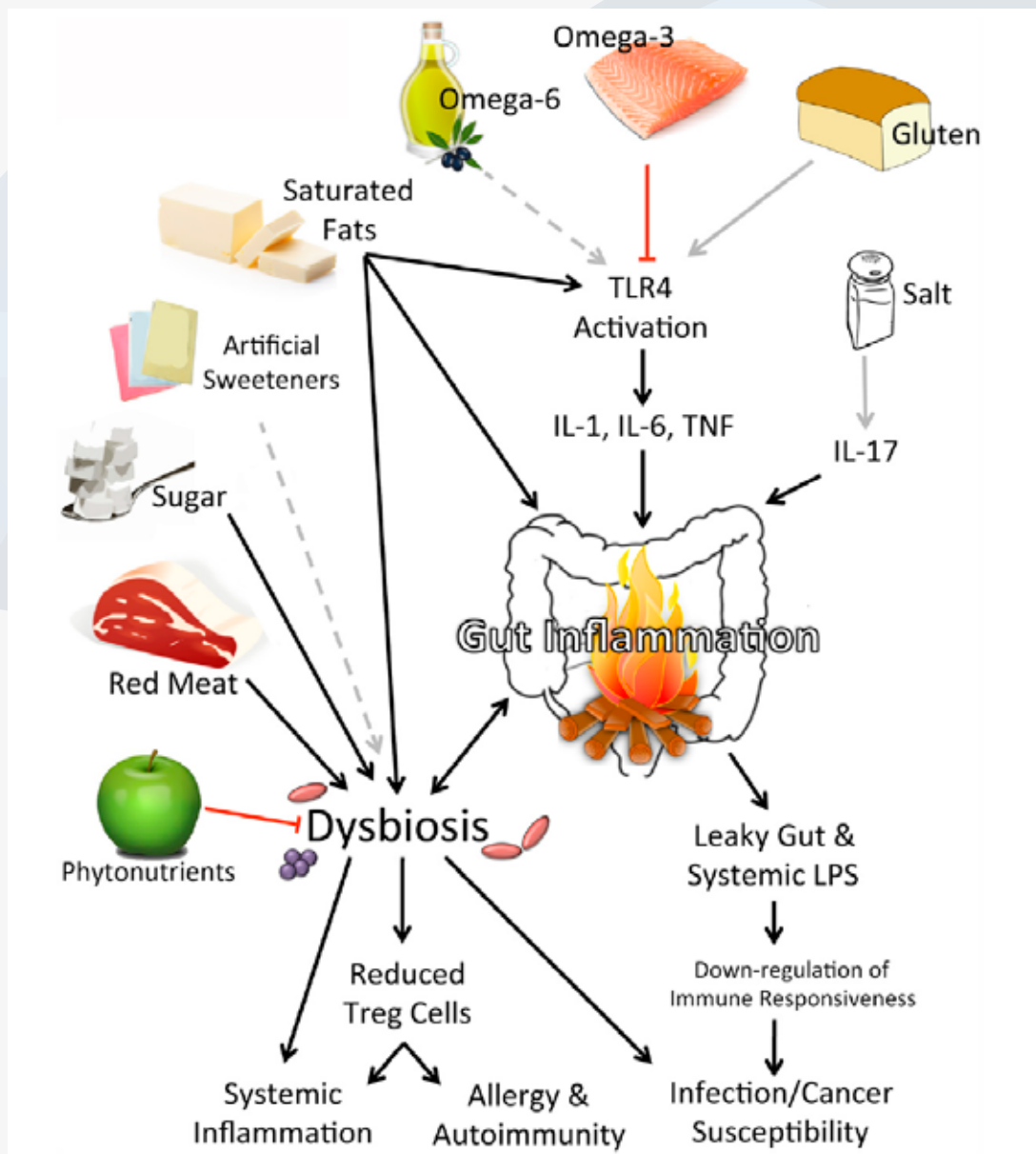
Un recente studio condotto da Gomez e Coll. ha indagato i fattori che modellano la composizione del microbioma intestinale, analizzando campioni fecali di 9 diverse specie di primati antropoidi e di 4 popolazioni umane (cacciatori-raccoglitori e agricoltori tradizionali), esposti a differenti pattern di sussistenza⁴². Gli autori ipotizzano che la similitudine compositiva riscontrata in primati filogeneticamente distanti (cacciatori-raccoglitori, agricoltori e scimmie del Vecchio Mondo) sia il risultato della condivisione di una dieta con elevata diversità di nutrienti e, come tale, costituita da più substrati per il microbiota, piuttosto che una singola categoria di alimenti. I più alti livelli di diversità microbica sono stati riscontrati in popolazioni che assumono fibre fermentabili. Al contrario, i primati che si basano su diete con il più alto contenuto di fibre complesse, come i gorilla, hanno mostrato livelli più bassi di diversità microbica. Tali risultati inducono ad evitare associazioni semplicistiche, a lungo riportate, quali “*enterotipo* con prevalenza di *Prevotella*-fibre

alimentari, frutta e verdura” ed “*enterotipo* con prevalenza di *Bacteroidetes* - proteine e grassi animali”. Nel complesso, questi risultati mostrano che il microbioma intestinale umano è altamente plastico a livello di genere e, contrariamente a quanto precedentemente ipotizzato⁴³, sarebbero i fattori ambientali i principali driver della composizione, più che l'evoluzione filogenetica delle comunità microbiche ospitate.

Un ampio studio di coorte (1514 soggetti arruolati) ha valutato l'impatto genetico dell'organismo ospite sul suo microbiota intestinale, confermando una stretta associazione tra il genotipo dell'individuo e la specificità tassonomica delle comunità microbiche durante la precoce colonizzazione post-natale e nel successivo sviluppo⁴⁴. Il lattosio viene idrolizzato nei suoi due monosaccaridi (galattosio e glucosio) dall'enzima lattasi-florizina idrolasi. La presenza di un polimorfismo funzionale del gene che codifica per questo enzima è correlata con l'abbondanza di bifidobatteri, fornendo la prova dell'interazione gene-dieta nella modulazione compositiva dei vantaggiosi bifidi⁴⁵.

Lo stile di vita e soprattutto la dieta influiscono sulla diversità del microbioma intestinale umano. È stato ampiamente dimostrato che una “western diet” (dieta ricca di carboidrati raffinati, grassi saturi, carni rosse e povera di vegetali, frutta e pesce) comporta effetti sul sistema immunitario e la composizione del microbiota. I dati raccolti dall'*American Gut Project* (parte del Microsetta Initiative), mostrano ad esempio che la differenza

tra individui che assumono solo alcune tipologie di vegetali a settimana rispetto a quelli che ne consumano oltre 30 varietà ha effetti sulla composizione microbica sensibilmente maggiori di quelli riscontrati a seguito di terapia antibiotica.



Tra i fattori ambientali la nutrizione del primo anno di vita riveste un ruolo cruciale nell'interazione tra il microbiota simbiotico e il sistema metabolico-immunitario dell'ospite.

Vari tipi di nutrienti introdotti con l'alimentazione complementare (fibre, amido, polifenoli, proteine) sono in grado di fornire risorse energetiche per entrambi. I composti alimentari indigeribili vengono fermentati da batteri della comunità microbica intestinale con la produzione di numerosi metaboliti, inclusi acidi grassi a catena corta, acidi biliari e trimetilammina-N-ossido (TMAO). Tali prodotti regolano l'omeostasi metabolica e immunitaria dell'ospite e di conseguenza lo stato di salute. Pertanto, perturbazioni compositive microbiche durante la prima infanzia contribuiscono alla suscettibilità verso malattie croniche in epoche successive della vita. La TMAO deriva dal catabolismo microbico di colina, fosfatidil-colina e L-carnitina, sostanze presenti nelle carni rosse, uova e nei prodotti lattiero-caseari ad alto contenuto di grassi, tutti comuni nella dieta occidentale.

In un'ampia coorte multicentrica (*Swiss Acute Coronary Syndrome Cohort*), pazienti affetti da sindrome coronarica acuta con elevati livelli di TMAO ($> 7,9$ micron) presentavano un rischio di eventi avversi cardiaci maggiori (MACE, *major adverse clinical events*), aumentato di sei volte a 30 giorni (odds ratio [OR]: 6.30; $P < 0,01$), rispetto a cardiopatici con tassi minori di TMAO ($< 2,56$ micron), di cinque volte a 6 mesi (OR

5,65, IC 95% 1,91-16,74; P <0.01) e maggiore mortalità a 7 anni, (OR 1,81; p <0,05)⁴⁶.

La cavità orale è una struttura anatomica complessa (labbra, guance, palato, denti, periodonzio, solchi gengivali) che ospita differenti popolazioni microbiche (microbiota orale), in sinergismo armonico (eubiosi), alcune delle quali evolutesi in sintonia con la specificità anatomo-funzionale dei microhabitat orali (circa 50 specie e 1000 sottospecie per sito)⁴⁷⁻⁴⁸.

Il microbioma orale può mostrare sensibili e rapide modificazioni compositive e metaboliche. Tali alterate dinamiche sono il risultato di molteplici fattori quali alimentazione, modificazioni del pH, patologie locali e sistemiche, interazioni tra batteri e, in un arco temporale più ampio, mutazioni geniche e *trasfer* genetico orizzontale che forniscono nuove proprietà al ceppo. In caso di disbiosi alcuni microrganismi alterano il *milieu* infiammatorio distrettuale espandendo la fisiologica flogosi minima persistente e di conseguenza interferendo con i *signalling pathways* dell'ospite che controllano proliferazione e differenziazione cellulare⁴⁹⁻⁵⁰. Una mole di evidenze testimoniano come il microbiota orale disbiotico possa estendere la sua influenza oltre la cavità, comportando patologie sistemiche⁵¹⁻⁵². Numerosi componenti del microbiota oro-faringeo transitano per lo stomaco e raggiungono l'intestino attraverso saliva, alimenti e bevande. Non può pertanto sorprendere il riscontro di una sovrapposizione dei batteri orali e intestinali in quasi la metà (45%) dei soggetti esaminati nello *Human Microbiome Project*⁵³.

Patogeni acido-resistenti quali *P. gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sono in grado di translocare nel colon, indurre disbiosi e alterarne le funzioni⁵⁴.

Nell'ambito dei fattori prenatali in grado di alterare l'equilibrio microbico intestinale della diade gestante-nascituro merita particolare menzione la periodontite materna sostenuta da *Porphyromonas gingivalis*⁵⁵⁻⁵⁶.

Il ferro somministrato con fortificazione (latte formula) o supplementazione (integratori) ha un impatto sensibile sulla composizione microbica intestinale. In un trial condotto dal gruppo svedese della Lonnerdal⁵⁷ lattanti di 6 mesi senza deficit marziale furono randomizzati per ricevere formula a basso contenuto di ferro (1,2 mg Fe/die), formula ad alto contenuto (6,6 mg Fe/die) o formula senza aggiunta di ferro, ma con integrazione di ferro solfato in gocce (6,6 mg Fe/die). Dopo solo 45 giorni di intervento, l'assunzione di 'latte' formulato ad alto contenuto di ferro era significativamente associato a minore abbondanza di bifidobatteri rispetto alla formula con basso tasso (p<0.001), senza aumento di patogeni e, inaspettatamente, incremento relativo di lattobacilli (p<0.0002). Rispetto al gruppo di lattanti alimentati con formula ad elevata supplementazione, la somministrazione di ferro in gocce, anche a dosaggio adeguato ai fabbisogni, comportava riduzione di lattobacilli (p<0.007) e streptococchi (p<0.0003), con incremento di clostridi (p<0.05) e *Bacteroides* (p<0.02). Va segnalato che nel presente studio tutti i gruppi ricevevano formula con aggiunta di galatto-oligosaccaridi (GOS, 3,3 g/L). Tali prebiotici potrebbero mitigare gli effetti negativi del ferro sul microbiota intestinale, considerando che il ferro in gocce è stato somministrato lontano dai pasti formula. Pertanto, non si può escludere un possibile effetto protettivo dei GOS.

Disbiosi

Per **disbiosi** intestinale si intende l'alterata composizione di un consorzio microbico. Tale condizione, associata a parto cesareo, antibiotico-terapia, stress fisico e psichico, pattern dietetici non salutari, alterata peristalsi, radiazioni, comporta modificazioni dell'attività metabolica batterica e/o lo shift della distribuzione locale delle comunità⁵⁸.

Alla disbiosi sono state associate patologie del tratto gastro-intestinale e di altri organi e distretti (apparato cardio-vascolare, respiratorio, cute, articolazioni, occhi, sistema metabolico, immunitario e nervoso centrale)⁵⁹⁻⁶¹.

L'inadeguata colonizzazione post-natale indotta da parto cesareo, la permanenza in ospedale e l'esposizione precoce e continua ad antibiotici sono fattori determinanti nell'alterare la composizione del microbiota intestinale, imputata nella patogenesi di alcune malattie immuno-mediate e metaboliche^{40,62}. La disbiosi costituisce difatti il *primum movens* di eventi concatenati: ritardo nella maturazione della barriera intestinale (*gut closure*), passaggio di antigeni batterici e alimentari, disregolazione immunitaria e flogosi locale.

Il taglio cesareo rappresenta la procedura chirurgica eseguita su donna più frequente al mondo. L'ulti-

mo documento redatto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (2012) ribadisce le precedenti raccomandazioni pubblicate nel 1985, precisando che valori superiori al 10-15% di tutti i parti potrebbero risultare dannosi sia per la mamma sia per il neonato. La posizione dell'OMS deriva dall'allarmante incremento del ricorso a tale modalità registrato negli ultimi decenni in Paesi con stile di vita occidentale.

Un ampio studio prospettico, condotto su più di un milione di bambini svedesi, ha esaminato l'associazione tra alcune condizioni perinatali (parto cesareo, prematurità, basso o elevato peso per età gestazionale, basso punteggio Apgar) e sviluppo di allergia alimentare (AA) in epoche successive della vita⁶³. Nell'ambito dei soggetti che l'avevano sviluppata durante i 13 anni del follow up (2,5%), la metà presentava almeno due forme di allergia alimentare diagnosticate in ambiente ospedaliero. L'allergia alimentare, di più frequente riscontro nelle femmine e nei bambini di madri affette da asma/malattie polmonari, è **risultata positivamente associata** ad alcune condizioni:

- parto cesareo (HR 1,21; 95% CI, 1,18-1,25), sia elettivo che di emergenza. Dai risultati emerge che il 17% di tutte le allergie alimentari potrebbe essere riconducibile al ricorso a tale modalità di partorire;
- neonati LGA (*large for gestational age*) (HR, 1,15; 95% CI, 1,10-1,19);
- neonati con basso punteggio Apgar (HR, 1,22; 95% CI, 1,10-1,36).

Di contro, l'allergia alimentare era negativamente associata alla grave prematurità (<32 settimane di gestazione) (HR, 0,74; 95% CI, 0,56-0,98). Nessuna associazione è stata invece evidenziata tra AA e prematurità moderata, basso peso alla nascita o in neonati SGA (*small for gestational age*).

Il deficit di crescita, noto con il termine anglosassone *failure to thrive* (FTT), è **un grave problema globale che**, particolarmente durante la prima infanzia, comporta ricadute negative sulla salute e sullo sviluppo neurologico a lungo termine.

Un recente studio prospettico di coorte, condotto dal Dipartimento di Pediatria della Duke University (USA), ha scoperto che il deficit di crescita in neonati *extremely preterm* (<28 settimane) è associato ad alterata composizione del microbiota intestinale e del metaboloma, durante le prime 9 settimane di vita⁶⁴. Rispetto ai lattanti pretermine con crescita adeguata per età, quelli con FTT presentavano una interruzione maturativa del microbiota intestinale, caratterizzata da bassa diversità compositiva, abbondanza di *Staphylococcaceae*, persistente prevalenza di *Enterobacteriaceae* e deficit di batteri strettamente anaerobi. I risultati non possono essere spiegati dall'età gestazionale, peraltro comune ai due gruppi analizzati, o dalle complicazioni secondarie all'estrema prematurità (sepsi ad esordio tardivo, enterocolite necrotizzante, perforazione intestinale spontanea). Il deficit di crescita era associato anche ad alterazioni metaboliche. Difatti, nonostante entrambi i gruppi avessero un apporto calorico simile, i neonati pretermine con FT mostravano un profilo metabolomico alterato: incremento delle acilcarnitine a catena corta e media, maggiore ossidazione degli acidi grassi. Tale riscontro riflette un aumento della lipolisi, condizione riscontrabile durante il digiuno.

Complessivamente, lo studio mostra che il microbiota intestinale di questi lattanti può avere un impatto sul metaboloma dell'ospite, rendendo il microbioma intestinale e il metaboloma potenziali target per gestire il deficit di crescita con interventi nutrizionali o con biomodulatori del microbiota intestinale (probiotici, prebiotici, simbiotici e postbiotici)⁶⁵.

Come tutti i fluidi a contatto con l'ambiente esterno, anche il latte materno ha un proprio microbiota, capace di condizionare e modulare il microbiota intestinale del neonato/lattante (*shaping*).

Nell'ultimo decennio, le nuove tecniche 'omiche' (neologismo derivato dal suffisso anglosassone 'omic') hanno ampliato la nostra conoscenza sul microbiota del latte umano e sulle variabili che ne influenzano composizione e funzione.

Dopo aver aggiustato i fattori confondenti, Moossavi e coll. hanno indagato la relazione tra fattori materni e infantili, diversità e composizione del microbiota del latte⁶⁶. I profili microbici del latte di nutrici analizzati nella CHILD *birth cohort* presentavano elevata variabilità, nonostante la presenza di un *core* dominato da proteobatteri e *firmicutes*, costituito da quattro cluster che potrebbero riflettere diverse fonti esogeni di batteri nel latte.

Tra i numerosi fattori esaminati, merita particolare menzione l'influenza che esercita la modalità di allattamento al seno: diretto al capezzolo o indiretto (almeno una porzione estratta con tiralatte e conservata). Dal lavoro emerge che l'allattamento indiretto è associato a una minore abbondanza di benefici bifidobatteri, all'incremento di *Enterobacteriaceae* e di potenziali patogeni opportunistici quali *Stenotrophomonas* e *Pseu-*

domonadaceae (verosimilmente associati al device). L'allattamento diretto al seno favorisce invece i *phyla* Actinobacteria e Veillonellaceae (famiglia presente nel microbiota orale). Il mancato attacco al capezzolo potrebbe impedire il trasferimento di batteri orali dal lattante al microbiota del latte materno, introducendo invece altri batteri dalla pompa. Tali risultati suggeriscono che i batteri del latte possano avere origine dalla cavità orale del bambino.

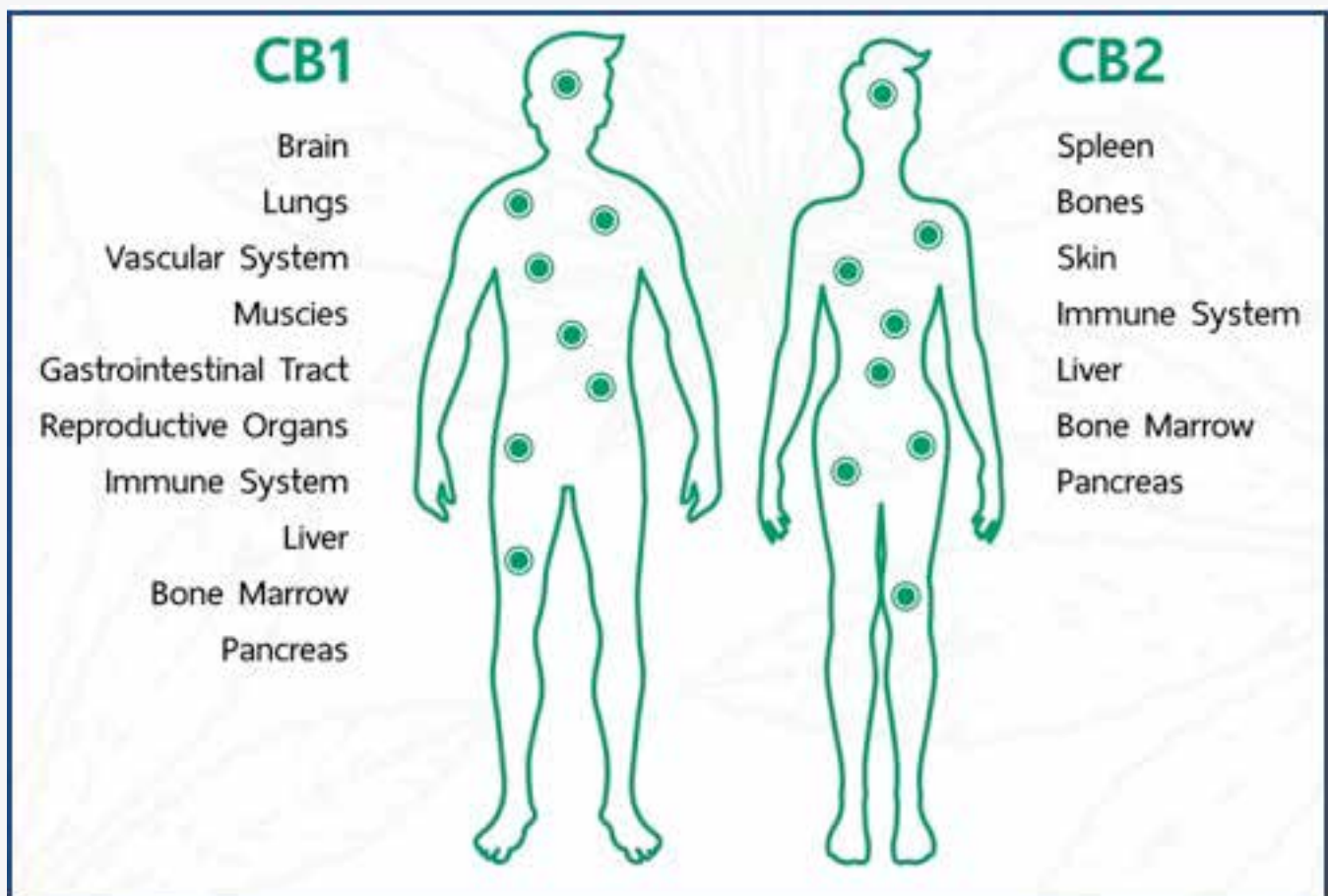
La disbiosi comporta alterata permeabilità intestinale, incremento dei livelli plasmatici di lipopolisaccaridi (LPS, componenti della parete cellulare esterna dei batteri gram-negativi), produzione di citochine proinfiammatorie, persistente flogosi low-grade, disregolazione del sistema endocannabinoide (eCB). Tali fattori sono imputati nella modulazione del bilancio energetico e dell'obesità⁶⁷⁻⁶⁸.

I lipopolisaccaridi batterici riducono l'espressione genica delle proteine associate alle *tight junctions* (zonulina-1, occludina, claudina) attraverso l'attivazione del fattore nucleare NFκB mentre le citochine proinfiammatorie (IL-1β, IL-6, TNF-α) sono responsabili dell'infiammazione locale e sistemica⁶⁹. A supporto dell'ipotesi "infezione metabolica" (disbiosi responsabile di infiammazione sistemica e del tessuto adiposo) è stato dimostrato che soggetti affetti da sindrome metabolica presentano una rimarchevole endotossinemia⁷⁰. Sistema endocannabinoide e lipopolisaccaridi (LPS) batterici sono coinvolti nella regolazione della adipogenesi. Condizioni di disbiosi incrementano la permeabilità intestinale e i livelli plasmatici di LPS, con rilascio di citochine proinfiammatorie.

Microbiota intestinale e Sistema endocannabinoide

Con il termine *cannabinoidi* (CB) si intendono tutti i composti capaci di legarsi ai recettori cannabinoidi presenti nel nostro organismo (CBR). Possono essere di origine vegetale (fitocannabinoidi), sintetica o endogena (eCB, endocannabinoidi). Gli eCB costituiscono una classe di composti lipidici, accomunati dalla capacità di interagire con specifici recettori che regolano numerose funzioni fisiologiche e comportamentali.

I recettori cannabinoidi insieme agli endocannabinoidi endogeni costituiscono il **sistema cannabinoide** (ECS)⁷¹.

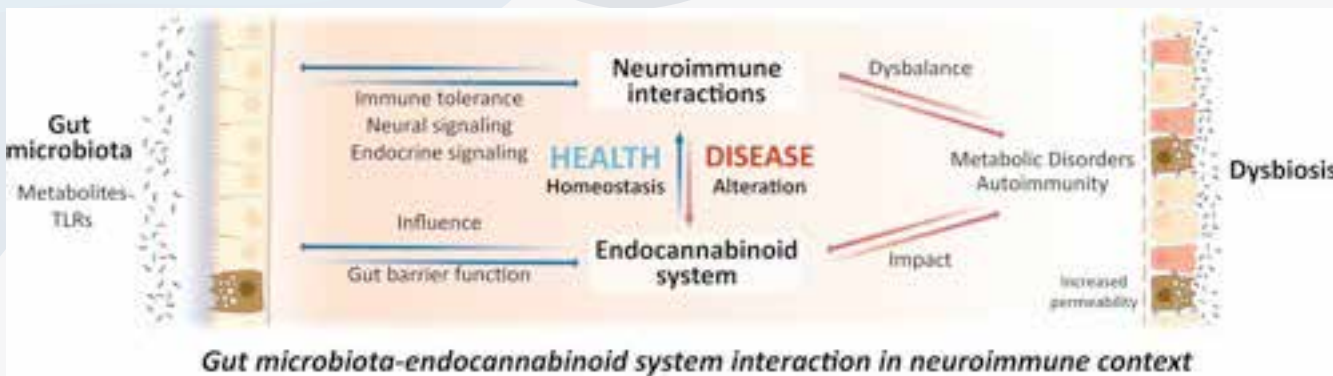


Tutti gli eCB derivano da acidi grassi polinsaturi, strutturalmente differenti dai cannabinoidi di origine vegetale (fitocannabinoidi), come il componente attivo della *cannabis* (delta-9-tetraidrocannabinolo o Thc), responsabile degli effetti psicoattivi. La canapa contiene anche il cannabidiolo (Cbd) che, a differenza del Thc, non ha effetti psicoattivi per l'incapacità di legarsi in concentrazioni apprezzabili né ai recettori (CBR1 e CBR2).

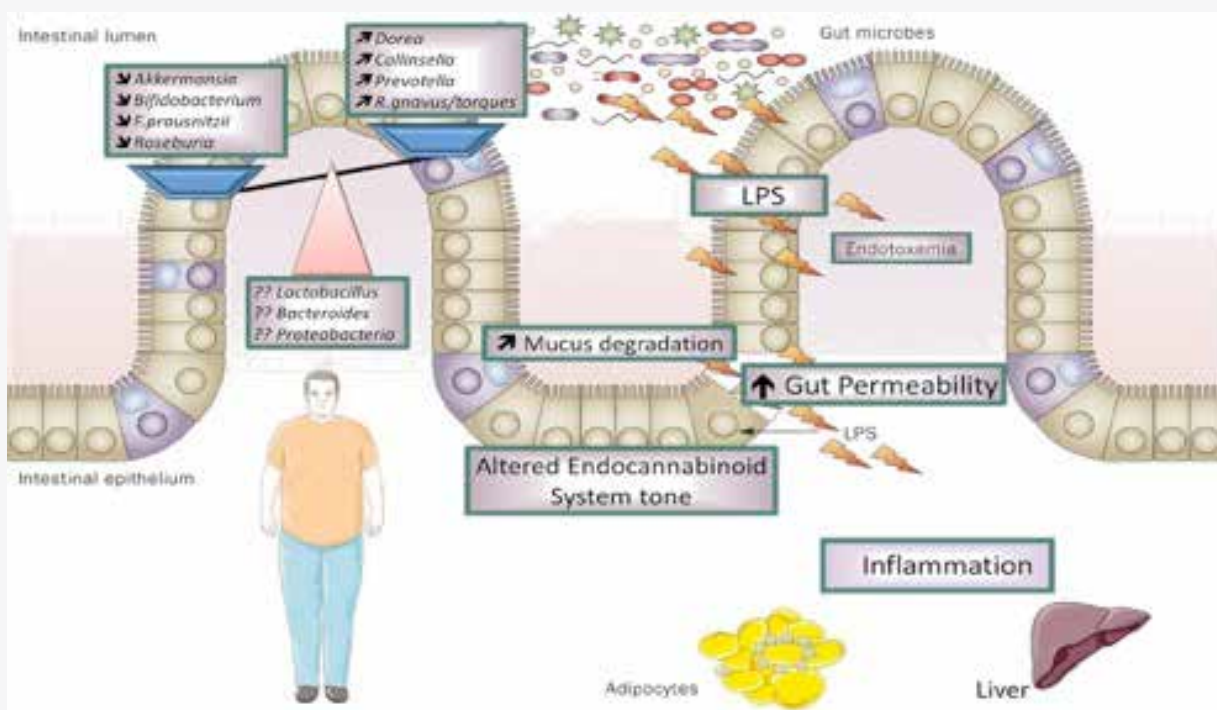
Tra le numerose funzioni (sviluppo neuronale, controllo della plasticità sinaptica, performance cognitive superiori, immunomodulazione, fertilità, gestazione, ecc.) il sistema endocannabinoide interviene nel bilancio energetico (regolazione dell'assunzione di cibo, modulazione dell'omeostasi metabolica) e sulla regolazione dell'appetito (modulazione del senso di sazietà), agendo su aree specifiche nel cervello.

Negli ultimi anni la ricerca ha permesso l'identificazione di un numero crescente di endocannabinoidi tra i quali l'anandamide e il 2-arachidonoil-glicerolo sono quelli maggiormente studiati.

Il microbiota intestinale "dialoga" ed interagisce con il sistema cannabinoide



Il sistema endocannabinoide, al pari del microbiota intestinale, è coinvolto nel controllo del metabolismo. La disbiosi è responsabile del rilascio dei LPS batterici (endotossinemia) a cui consegue alterata permeabilità della barriera epiteliale, flogosi, eccessiva stimolazione (ipertono) del sistema endocannabinoide e adipogenesi⁷². In modelli murini l'attivazione dei recettore di tipo 1 (CBR1) incrementa i livelli circolanti di lipopolisaccaride (LPS), endotossina rilasciata da batteri Gram-negativi. Il meccanismo ipotizzato comporta la ridotta espressione delle proteine delle *tight junctions*, occludina e zonula occludens-1 con conseguente aumento della permeabilità intestinale⁷³.



La segnalazione endocannabinoide nell'intestino tenue è scatenata dal digiuno, inducendo un *alert* di fame che agisce sui recettori locali (CBR1) per inibire il senso di sazietà.

Durante il digiuno gli endocannabinoidi vengono rilasciati in aree cerebrali coinvolte nel controllo dell'apporto alimentare (mesolimbo e ipotalamo) al fine di indurre la motivazione ad assumere cibo, riducendosi una volta appagata la sensazione di fame.

Nel corso dell'evoluzione il sistema eCB ha contribuito a stimolare la ricerca di cibo in condizioni di ristrettezza alimentare, favorendo al tempo stesso l'accumulo delle risorse energetiche nei depositi corporei periferici (*in primis* quello adiposo).

A supporto del loro ruolo "ancestrale" va ricordato che gli endocannabinoidi sono presenti nel latte materno dove rivestono un ruolo cruciale nelle prime fasi della lattazione. Tale sistema protettivo rappresenta uno svantaggio metabolico in condizioni di facile disponibilità di cibo, come avviene in contesti socio-economici dei Paesi occidentali.

Alcuni microorganismi commensali producono molecole derivate dagli acidi grassi, chimicamente simili agli endocannabinoidi e ai mediatori ad essi correlati, legandosi agli stessi recettori, influenzando il signaling dell'*endocannabidioma* dell'intestino e di altri organi.

In un futuro prossimo, i big data provenienti dalle scienze omiche, dallo studio sui meccanismi molecolari alla base del dialogo tra microbiota e organismo ospite, dall'analisi sull'interazione microbiota/*esposoma* (somma dei fattori ambientali), evolutasi in milioni di anni, permetteranno un approccio diagnostico e verosimilmente terapeutico 'su misura' a numerose patologie ancora celate nel fantastico microcosmo intestinale.

Bibliografia

1. Ma'ayan A. Complex systems biology. *J R Soc Interface*. 2017; 14 (134).
2. de la Torre Gomez C, Goreham RV, Bech Serra JJ, et al. "Exosomes"-A Review of Biophysics, Biology and Biochemistry of Exosomes With a Focus on Human Breast Milk. *Front Genet*. 2018; 9:92.
3. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2016; 36, 301–312.
4. Lawson C, Vicencio JM, Yellon D, et al. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *J. Endocrinol*. 2016; 228: 57–71.
5. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, et al. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*. 2019; 3;8. pii: E307.
6. Gensollen T, Iyer, SS, Kasper DL, et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*. 2016; 352: 539–544.
7. Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006; 7:688.
8. Henderson B, Wilson M. Homo bacteriens and a network of surprises. *J Med Microbiol*. 1996; 45: 393–4.
9. Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, et al. Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems*. 2016; 1.
10. Pasolli E, Asnicar F, Manara S, et al. Extensive unexplored human microbiome diversity revealed by over 150,000 genomes from metagenomics spanning age, geography, and lifestyle. *Cell*. 2019; 176: 649–662.
11. Wassenaar TM., Panigrahi P. Is a foetus developing in a sterile environment? *Lett. Appl. Microbiol*. 2014; 59: 572–579.
12. Jimenez E., Marin M.L., Martin R., et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol*. 2008; 159: 187–193.
13. Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med*. 2014; 6: 237.
14. Steel JH, Malatos S, Kennea N, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr. Res*. 2005; 57: 404–411.
15. Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, et al. Meconium microbiome analysis

- identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One*. 2014; 9: e90784.
16. Lim E.S., Wang D., Holtz L.R. The bacterial microbiome and virome milestones of infant development. *Trends Microbiol*. 2016; 24: 801–810.
 17. Miniello VL, Brunetti L, Tesse R, et al. *Lactobacillus reuteri* modulates cytokines production in exhaled breath condensate of children with atopic dermatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010; 50: 573-6.
 18. Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006; 312: 1355–1359.
 19. Aroniadis OC, Brandt LJ. Intestinal microbiota and the efficacy of fecal microbiota transplantation in gastrointestinal disease, *Gastroenterol Hepatol*. 2014; 10: 230-7.
 20. Obata T, Goto Y, Kunisawa J, et al. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2010; 107: 7419–24.
 21. Latorre E, Layunta E Grasa L Toll-like receptors 2 and 4 modulate intestinal IL-10 differently in ileum and colon. *United European Gastroenterol J*. 2018; 6: 446-453.
 22. Fung TC, Bessman NJ, Hepworth MR, et al. Lymphoid-Tissue-Resident Commensal Bacteria Promote Members of the IL-10 Cytokine Family to Establish Mutualism. *Immunity*. 2016; 44: 634-646.
 23. Shibata N, Kunisawa J, Hosomi K, et al. Lymphoid tissue-resident *Alcaligenes* LPS induces IgA production without excessive inflammatory responses via weak TLR4 agonist activity. *Mucosal Immunol*. 2018; 11: 693-702.
 24. Xu J, Gordon JI. Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci*. 2003; 100: 10452-9.
 25. Backhed F, Fraser CM, Ringel Y, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Micr*. 2012; 12: 611–22.
 26. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012; 486: 222-7.
 27. Mills S, Stanton C, Lane JA, et al. Precision nutrition and the microbiome, part I: current state of the science. *Nutrients*. 2019; 11: 923.
 28. Mills S, Lane JA, Smith GJ, et al. Precision nutrition and the microbiome Part II: potential opportunities and pathways to commercialisation. *Nutrients*. 2019; 11: 1468.
 29. Walker WA. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Ann Nutr Metab* 2013; 2:S8–S15.
 30. Rowland I, Gibson G, Heinken A. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2018; 57: 1-24.
 31. Berni Canani R, Paparo L, Nocerino R, et al. Gut Microbiome as Target for Innovative Strategies Against Food Allergy. *Front Immunol*. 2019; 10: 191.
 32. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 2012; 489:231-41.
 33. Prescott SL, Logan AC, Millstein RA, et al. Biodiversity, the human microbiome and mental health: moving toward a new clinical ecology for the 21st Century? *Int. J. Biodiversity*. 2016, 2718275.
 34. Ait-Belgnaoui A, Durand H, et al. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2012; 37: 1885–95.
 35. Barrett E, Ross RP, O’Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J Appl Microbiol*. 2012; 113: 411–7.
 36. Stasi C, Sadalla S, Milani S. The Relationship Between the Serotonin Metabolism, Gut-Microbiota and the Gut-Brain Axis. *Curr Drug Metab*. 2019; 20: 646-655.
 37. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res*. 2018; 1693: 128-133.
 38. Cheung SG, Goldenthal AR, Uhlemann AC, et al. Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression. *Front Psychiatry*. 2019; 10: 34.

39. McDonald D, Hyde E, Debelius JW, et al. American Gut: an Open Platform for Citizen Science Microbiome Research. *mSystems*. 2018 ;3. pii: e00031-18.
40. Miniello VL, Diaferio L, Lassandro C, et al. The Importance of Being Eubiotic. *J Prob Health*. 2017; 5: 1-9.
41. Smith-Brown P, Morrison M, Krause L, et al. Mothers Secretor Status Affects Development of Childrens Microbiota Composition and Function: A Pilot Study. *PLoS One*. 2016; 11: e0161211.
42. Gomez A, Sharma AK, Mallott EK, et al. Plasticity in the human gut microbiome defies evolutionary constraints. *mSphere* 4: 2019; 4. pii: e00271-19.
43. Ochman H, Worobey M, Kuo CH, et al. Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biol*. 2010; 8: e1000546.
44. Bonder MJ, Kurilshikov A, Tigchelaar EF, et al. The effect of host genetics on the gutmicrobiome. *Nat Genet* 2016; 48:1407-12.
45. Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017;81:e00036.
46. Li XS, Obeid S, Klingenberg R, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide in acute coronary syndromes: a prognostic marker for incident cardiovascular events beyond traditional risk factors. *Eur Heart J*. 2017; 38: 814-824.
47. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019; 23: 122-128.
48. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16: 745-759.
49. Cugini C, Klepac-Ceraj V, Rackaityte E, et al. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *J. Oral Microbiol*. 2013; 5, 19804.
50. Takahashi, N. Oral microbiome metabolism: from “who are they?” to “what are they doing?”. *J Dent Res*. 2015; 94: 1628-37.
51. Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat. Rev. Immunol*. 2015; 15: 30–44.
52. Belstrøm D. The salivary microbiota in health and disease. *J Oral Microbiol*. 2020; 12: 1723975.
53. Segata N, Haake SK, Mannon P, et al. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol*. 2012; 13: R42.
54. Sato K, Takahashi N, Kato T, et al. Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered *Porphyromonas gingivalis* through modulation of the gut microbiota and gut immune system. *Sci Rep*. 2017; 7: 6955.
55. Tamburini S, Shen N, Wu HC2,3, Clemente JC1. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med*. 2016; 22: 713-22.
56. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16:745-759.
57. Simonyté Sjödin K, Domellöf M, Lagerqvist C, et al. Administration of ferrous sulfate drops has significant effects on the gut microbiota of iron-sufficient infants: a randomised controlled study. *Gut*. 2018; pii: gutjnl-2018-316988.
58. Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: A review. *Altern Med Rev*. 2004; 9:180–197.
59. Sekirov I, Russell SL, Antunes CM, et al. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010; 90: 859–904.
60. Sherwin E, Dinan TG, Cryan JF. Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2018; 1420: 5–25.
61. Sartor RB, Wu GD. Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. *Gastroenterology*. 2017; 152: 327–9.
62. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed *Bacteroidetes* colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean

- section. *Gut*. 2014;63:559-66.
63. Mitselou N, Hallberg J, Stephansson O, et al. Cesarean delivery, preterm birth, and risk of food allergy: Nationwide Swedish cohort study of more than 1 million children. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:1510-1514.
 64. Younge NE, Newgard CB, Cotten CM, et al. Disrupted maturation of the microbiota and metabolome among extremely preterm infants with postnatal growth failure. *Sci Rep*. 2019; 9: 8167.
 65. Miniello VL, Diaferio L, Cristofori F, et al. Gut microbiota biomodulators, when the stork comes by the scalpel. *Clin Chim Acta*. 2015; 451: 88-96.
 66. Moossavi S, Sepehri S, Robertson B, et al. Composition and variation of the human milk microbiota are influenced by maternal and early-life factors. *Cell Host Microbe*. 2019; 25:324-35.
 67. Kobylak N, Virchenko O, Falalyeyeva T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. *Nutr J*. 2016; 15:43.
 68. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*. 2009; 15: 1546-58.
 69. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, et al. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2017; 279: 70-89.
 70. Lassenius MI, Pietilainen KH, Kaartinen K et al. Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care*. 2011; 34: 1809-15.
 71. Moreno-Navarrete JM, Fernandez-Real JM. The gut microbiota modulates both browning of white adipose tissue and the activity of brown adipose tissue. *Rev Endocr Metab Disord*. 2019; 20: 387-397.
 72. Di Patrizio NV. Endocannabinoids in the Gut. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2016; 1: 67-77.
 73. Muccioli GG, Naslain D, Backhed F, et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol*. 2010; 6: 39-2
-