

Lectures of the School of Advanced Training on the Pediatric Microbiota [Scuola di Alta Formazione sul Microbiota in Età Pediatria]

AN ALL-AROUND VIEW OF THE MICROBIOTA FOR
CLINICAL PEDIATRIC PRACTICE
[IL MICROBIOTA A 360 GRADI PER LA PRATICA CLINICA
PEDIATRICA]

WEBINAR • FEBRUARY-MARCH 2022

The meeting has been organized with the unconditional contribution of BROMATECH.

SCIENTIFIC COMMITTEE

Vassilios Fanos (Cagliari, Italy), Marcello Romeo (Pavia, Italy)

SPEAKERS

Diego Peroni (Pisa, Italy), Marcello Romeo (Pavia, Italy), Maria Rescigno (Milan, Italy), Gian Luigi Marseglia (Pavia, Italy), Giuseppe Banderali (Milan, Italy), Gianfranco Trapani (Sanremo, Italy), Livia Emma (Turin, Italy), Francesco Cappello (Palermo, Italy), Ruggiero Francavilla (Bari, Italy), Annamaria Staiano (Naples, Italy), Paola Rossi (Pavia, Italy), Michele Mussap (Cagliari, Italy), Andrea Maglioni (Civitella di Romagna, Italy)

With the patronage of



With the unconditional contribution of



How to cite

[Lecture's authors]. [Lecture's title]. In: Lectures of the School of Advanced Training on the Pediatric Microbiota [Scuola di Alta Formazione sul Microbiota in Età Pediatrica]; webinar; February-March 2022. *J Pediatr Neonat Individual Med.* 2022;11(2):e110220. doi: 10.7363/110220.

LECT 1

THE SCHOOL OF ADVANCED TRAINING ON THE PEDIATRIC MICROBIOTA [LA SCUOLA DI ALTA FORMAZIONE SUL MICROBIOTA IN ETÀ PEDIATRICA]

V. Fanos¹, M. Romeo²

¹Neonatal Intensive Care Unit, AOU Cagliari, Department of Surgery, University of Cagliari, Cagliari, Italy

²Department of Biology and Biotechnology, University of Pavia, Pavia, Italy

ENGLISH TEXT

The development and maturation of the neonatal gut microbiota constitute a dynamic process characterized by important interactions between the microorganisms that characterize our microbiota and the host organism. This process is influenced by various perinatal conditions, such as mode of delivery, type of feeding, and medication use. The mother's diet, age and metabolic status, family genetics, lifestyle and environment also have a significant impact on the neonatal and infant microbiota. Recently published scientific evidence identifies a critical window of vulnerability (the first 1,000 days of a child's life) in which these factors can alter the physiological developmental trajectory of the microbiota with short- and long-term repercussions on its health.

The School of Advanced Training on the Pediatric Microbiota aimed to promote and develop, from a multidisciplinary perspective, the latest knowledge related to the role of the human microbiota in neonatal and pediatric settings, providing a modern-day view of gut ecology. The course modules were designed to provide detailed scientific training on the foundational mechanisms in contributing to the maintenance of maternal and child health and well-being from the earliest stages of life.

Each module has included the presence of recognized experts and lecturers in the field, who will offer a thorough examination of the clinical aspects of the most frequent pathologies of childhood, with particular attention to the innovative possibilities

of modulating the intestinal biome, through the integrated use of specific selective physiological bacteria with probiotic action.

Pregnancy, birth, breastfeeding and growth are the pillars of the individual's foundation. He was certainly not wrong who said that it is far better to build a healthy child than to fix a sick adult.

The first 1,000 days from conception ("a thousand days of you and me," mother and baby, to remind us through the verse of a wonderful Italian song) are strategically decisive for all future health, which equals all future life. Today even this concept of the first 1,000 days is already surpassed by the formula 6 + 9 + 6, meaning the six months before pregnancy, the nine months of pregnancy, the six months after birth (those of breastfeeding). Wanting to use the language of medicine, these are the concepts of Perinatal Programming and the Developmental Origins of Health and Disease.

In this puzzle, the real protagonists are the pioneer bacteria, those that arrive first and first colonize body districts, control the territory and never want to leave; it becomes not easy or difficult to replace them, for better or worse. If we could play back to the future and choose our future, we would choose thin grandparents, a healthy mother who has a normal pregnancy coming to term, a spontaneous birth, breastfeeding for six months.

In this case we would receive the good start-of-life microbes (*Lactobacilli* and *Bifidobacteria*), old friends of the human species. For example, in the case of cesarean section, breast milk is a rescue therapy because it provides the "good bacteria", the same bacteria that the newborn should have received from the maternal vagina in the case of spontaneous birth.

In essence, we are realizing, slowly but surely, we are getting there, that the microbiota is not just an additional organ that we still forget about, but is an essential component of what it means to be human and therefore needs to be increasingly investigated and known by physicians and health care providers. Physicians of the future will become true engineers of the microbiota, manipulating the communities of bacteria we harbor in our favor. Already in the near future, it will be possible to integrate and modulate our microbiota artificially, obtaining an individualized supermicrobiota: we will become not supermen, but "augmented" men. Thus, the child of the future, the "augmented" child, will also be able to be enhanced through a treatment of "good bacteria" administered to the mother-to-be before conception, or to the pregnant mother, or to

the infant himself after birth, with lifelong positive effects in terms of health. Pioneer bacteria are true pillars of health, influencing all future life.

The gut microbiota has bridges (called axes) with many distant organs, for example the brain, mouth, lung and skin. Each of these organs constitutes a world apart with distinctive microbial populations, laws and district rules. There is a dense dialogue between the various organs with each other, and metabolomics now allows us to decipher and understand many of these communications, the secret language of our bodies. The creation of these networks by pioneer bacteria early in life is the foundation of the pillars of health, good or bad. Much of who we are is who we were at three years of life. Knowledge of these networks can help us better understand disease, treat it, and especially prevent it in a personalized way from the moment of birth and even earlier.

ITALIAN TEXT

Lo sviluppo e la maturazione del microbiota intestinale neonatale costituiscono un processo dinamico caratterizzato da importanti interazioni tra i microrganismi che caratterizzano il nostro microbiota e l'organismo ospite. Questo processo è influenzato da varie condizioni perinatali, come la modalità di parto, il tipo di alimentazione e l'uso di farmaci. Anche la dieta, l'età e lo stato metabolico della madre, la genetica familiare, lo stile di vita e l'ambiente hanno un impatto significativo sul microbiota neonatale e infantile. Le evidenze scientifiche pubblicate di recente individuano una finestra critica di vulnerabilità, che coincide con i primi 1.000 giorni di vita del bambino, in cui questi fattori possono modificare la fisiologica traiettoria di sviluppo del microbiota con ripercussioni a breve e a lungo termine sulla sua salute.

La Scuola di Alta Formazione sul Microbiota in Età Pediatrica intende promuovere e sviluppare, in una visione multidisciplinare, le conoscenze più recenti relative al ruolo del microbiota umano in ambito neonatale e pediatrico, fornendo una visione in chiave moderna dell'ecologia intestinale. I moduli del corso sono stati pensati per offrire una formazione scientifica dettagliata sui meccanismi fondanti nel contribuire al mantenimento della salute e del benessere della mamma e del bambino, fin dalle prime fasi della sua vita.

Ciascun modulo ha previsto la presenza di riconosciuti esperti e docenti del settore, che hanno proposto una disamina accurata degli aspetti clinici delle più frequenti patologie dell'infanzia, con particolare attenzione alle innovative possibilità

di modulazione del bioma intestinale, attraverso l'impiego integrato di specifici batteri fisiologici selettivi ad azione probiotica.

Gravidanza, nascita, allattamento e crescita sono i pilastri della fondazione dell'individuo. E di certo non si sbagliava chi diceva che è molto meglio costruire un bambino sano piuttosto che aggiustare un adulto malato.

I primi 1.000 giorni dal concepimento (“mille giorni di te e di me”, mamma e bambino, per ricordarcelo attraverso il verso di una splendida canzone Italiana) sono strategicamente decisivi per tutta la salute futura, il che equivale a tutta la vita futura. Oggi anche questo concetto dei primi 1.000 giorni è già superato dalla formula 6 + 9 + 6, che significa i sei mesi prima della gravidanza, i nove mesi della gravidanza, i sei mesi dopo la nascita (quelli dell'allattamento al seno). Volendo usare il linguaggio della medicina, sono i concetti del *Perinatal Programming* e delle *Developmental Origins of Health and Disease*.

In questo puzzle i veri protagonisti sono i batteri pionieri, quelli che arrivano per primi e per primi colonizzano i distretti corporei, controllano il territorio e non se ne vogliono più andare; diventa non facile o difficile sostituirli, nel bene e nel male. Se potessimo giocare a *back to the future* e scegliere il nostro futuro, sceglieremmo nonni magri, una madre sana che ha una gravidanza normale che giunge al termine, un parto spontaneo, l'allattamento al seno per sei mesi. In questo caso riceveremmo i microbi del buon inizio vita (*Lactobacilli* e *Bifidobatteri*), vecchi amici della specie umana. Ad esempio, in caso di taglio cesareo, il latte materno costituisce un'ancora di salvataggio perché fornisce i “batteri buoni”, gli stessi che il neonato avrebbe dovuto ricevere dalla vagina materna in caso di parto spontaneo.

In buona sostanza stiamo capendo, lentamente ma ci stiamo arrivando, che il microbiota non è solo un organo aggiuntivo di cui ancora ci dimentichiamo, ma è una componente essenziale di ciò che significa essere umani e per questo deve essere sempre più indagato e conosciuto dai medici e dagli operatori sanitari.

I medici del futuro diventeranno veri e propri ingegneri del microbiota, manipolando a nostro favore le comunità di batteri che alberghiamo. Già nell'immediato futuro, si potrà integrare e modulare il nostro microbiota artificialmente ottenendo un supermicrobiota individualizzato: diventeremo non superuomini, ma uomini “aumentati”. Così il bambino dell'avvenire, il bambino “aumentato”,

potrà anche lui essere potenziato attraverso una cura di “batteri buoni” somministrati alla futura madre prima del concepimento, o alla madre in gravidanza o al neonato stesso dopo la nascita, con effetti positivi per tutta la vita in termini di salute. I batteri pionieri sono veri e propri pilastri della salute, che influenzano tutta la vita futura.

Il microbiota dell'intestino ha ponti (chiamati assi) con molti organi lontani, in particolare il cervello, la bocca, il polmone e la cute. Ciascuno di questi organi costituisce un mondo a parte con popolazioni microbiche, leggi e regole distrettuali peculiari. Vi è un fitto dialogo tra i vari organi e la metabolomica ci consente oggi di decifrare e capire molte di queste comunicazioni, il linguaggio segreto del nostro corpo. La creazione di queste reti da parte dei batteri pionieri, nelle prime fasi della vita, costituisce la fondazione dei pilastri della salute, buona o cattiva. Molto di ciò che noi siamo è quello che eravamo a tre anni di vita. La conoscenza di queste reti può aiutarci a comprendere meglio le malattie, a curarle e soprattutto a prevenirle in modo personalizzato dal momento della nascita e anche prima.

REFERENCES

- Fanos V. Metabolomica e microbiomica. La medicina personalizzata dal feto all'adulto. Quartu Sant'Elena: Hygeia Press, 2015.
- Fanos V. Dieta e microbiota. Alimenti, batteri, probiotici e salute. Quartu Sant'Elena: Hygeia Press, 2017.
- Trapani G, Fanos V. Sano intestino, felice bambino. Intestino, cibo, batteri e benessere naturale. Quartu Sant'Elena: Hygeia Press, 2019.
- Fanos V. I batteri pionieri, pilastri della salute. Quartu Sant'Elena: Hygeia Press, 2021.
- Coscia A, Bardanzellu F, Caboni E, Fanos V, Peroni DG. When a Neonate Is Born, So Is a Microbiota. *Life (Basel)*. 2021;11(2):148.
- Cocchi M, Romeo M. Homo bacteriens. Una moderna visione della complessa e affascinante relazione tra microbiota e uomo. Milan: CEC Editore, 2021.

LECT 2

YOU WILL NEVER FORGET YOUR FIRST MICROBIOTA [IL PRIMO MICROBIOTA NON SI SCORDA MAI]

V. Fanos

Neonatal Intensive Care Unit, AOU Cagliari, Department of Surgery, University of Cagliari, Cagliari, Italy

ENGLISH TEXT

Nature orchestrates microbiota development for mating, fecundity, and colonization in the

perinatal period to maximize the success of the next generation.

Several studies emphasize the importance of vaginal microflora (vaginal bacteria) as a predictor in the first trimester of pregnancy. Wanting to summarize, we can say that the normal vaginal microbiota contains high amounts of *L. crispatus* and very low amounts of *G. vaginalis* (an anaerobic bacterium). The situation is reversed in bacterial vaginosis. The most interesting aspect concerns the possibility that the bacteria may help us recognize early and prevent the risk of preterm delivery.

We now know that both the placenta and the amniotic fluid possess their own kits of bacteria even in the absence of maternal infection: it is believed that they may serve to educate the fetus' immune system to prepare it for future life outside the womb. The bacteria in the placenta are identical to those in the mother's throat and different from all other bacteria in the mother. Mothers with chronic periodontitis are more likely to have a premature birth than control mothers without such an oral cavity problem.

During birth and rapidly thereafter, the infant is massively colonized with trillions of bacteria. Being born spontaneously means diving into the greatest probiotic drink of life: the infant, passing through the vaginal canal, comes in contact with the predominant bacteria in the mother's vagina, which are *Lactobacilli*. Being born by cesarean section, on the other hand, means being deprived of this advantage and having on one's skin the bacteria from the hands of health workers, the hospital environment and the mother's skin. Today it is possible to hypothesize a restoration of bacterial flora hypothetically similar to that of the spontaneous birth by colonizing the infant's skin with gauze soaked in the mother's vaginal fluid. Interestingly, birth by emergency cesarean section is associated with bacteria more similar to those of spontaneous birth than those born by iterative cesarean section (performed for previous cesarean): this peculiarity is likely related to the different amount of stress hormones in the two cases. In general terms, infants born by cesarean section are less protected, with negative implications on their health status in the long run compared to those born spontaneously: in particular, they have a higher risk of immune disorders such as allergies, asthma, type 1 diabetes, and obesity.

Good thing there is breast milk, which is a rescue therapy. Therefore, a baby born by cesarean section can still acquire a good gut microbiota thanks to its

mother's milk, going on to positively influence the outcome of assisted delivery.

The pregnant mother is itself a community, one with its own bacteria, what is called a "holobiont" in scientific terms. Actually, being born means moving from one association of living organisms (a symbiotic consortium) to another association of living organisms. Each newborn begins life outside the womb with a unique set of bacteria. There is no infant microbiota identical to that of others. Each of us is a unique ecosystem!

Bifidobacteria (a bacterial genus belonging to the phylum *Actinobacteria*) assume particular importance in pediatric life. They are so called because many exhibit a bifid appearance. In fact, under physiological conditions, the intestinal microbiota of a newborn and infant, up to weaning, is particularly rich in *Bifidobacteria*, which may account for as much as 50% of the total infant microbiota.

These bacteria perform a number of useful services for the newborn. First, they actively prevent colonization by "bad bacteria" in the gut, helping to stimulate and support the immune system. Second, they provide essential vitamins to the newborn. *Bifidobacteria* are so numerous in the little patient because they are essential for metabolizing HMOs (human milk oligosaccharides), i.e., the oligosaccharides in breast milk or, in their absence, the glycans present in mucin, the layer of mucus that thickens the intestinal mucosa making it less permeable.

Bifidobacteria are excellent bacteria for colonizing the intestine at birth.

Comparison of old and current studies on the microbiota highlights a recent loss of *Bifidobacteria*, which can almost be considered "missing microbes," lost bacteria, in connection with inappropriate use of antibiotics and formula milk, and excessive hygiene and high rates of cesarean sections.

Breast milk is much more than food for the infant! Today we know that there is a significant amount of bacteria in breast milk, a microbiota composed of 50 genera and 200 species, which come from sources inside and outside the udder. This is referred to as MOM: milk-oriented microbiota.

Basically, it is our mothers who equip us with the first microbiota during vaginal delivery and modulate it through individualized maternal breastfeeding. Three-quarters of the human microbiota comes from the mother, a "bacterial baptism" that can positively influence our lives forever, protecting us from diseases such as

allergies, asthma, celiac disease, and obesity. "Native core microbiota" is called the initial endowment of microorganisms that the newborn receives from the mother (during birth and breastfeeding) and the environment, and which is the foundation of the microbiota in later ages.

ITALIAN TEXT

La natura orchestra lo sviluppo del microbiota per l'accoppiamento, la fecondità e la colonizzazione nel periodo perinatale, al fine di massimizzare il successo della generazione successiva.

Diversi studi sottolineano l'importanza della microflora vaginale (i batteri vaginali) come elemento predittivo nel primo trimestre di gravidanza. Volendo sintetizzare, possiamo dire che il normale microbiota vaginale contiene elevate quantità di *L. crispatus* e bassissime di *G. vaginalis* (un batterio anaerobio). La situazione si inverte nella vaginosi batterica.

L'aspetto più interessante riguarda la possibilità che i batteri possano aiutarci a riconoscere precocemente e a prevenire il rischio di parto pretermine.

Oggi sappiamo che sia la placenta sia il liquido amniotico possiedono un loro corredo di batteri anche in assenza di infezioni materne: si ritiene che possano servire ad educare il sistema immunitario del feto per prepararlo alla vita futura al di fuori del grembo materno. I batteri nella placenta sono identici a quelli della gola della mamma e diversi da tutti gli altri batteri presenti nella mamma. Le madri con periodontiti croniche hanno una più elevata probabilità di avere un parto prematuro rispetto alle madri di controllo senza tale problema al cavo orale.

Durante la nascita e rapidamente in seguito, il neonato viene massicciamente colonizzato con bilioni di batteri. Nascere per via spontanea significa tuffarsi nella più grande bevanda probiotica della vita: il neonato, attraversando il canale vaginale, viene a contatto con i batteri predominanti nella vagina della mamma, che sono i *Lactobacilli*. Nascere da taglio cesareo significa invece essere privati di questo vantaggio ed avere sulla propria cute i batteri delle mani degli operatori sanitari, dell'ambiente ospedaliero e della cute della mamma. Oggi è possibile ipotizzare un ripristino della flora batterica ipoteticamente simile a quella del nato da parto spontaneo colonizzando la cute del neonato con garze imbevute di liquido vaginale della mamma. È interessante notare che la nascita da un taglio cesareo di emergenza si associa a batteri più simili a quelli della nascita spontanea, rispetto a chi nasce da taglio cesareo iterativo (eseguito per pregresso cesareo): questa particolarità è verosimilmente legata

alla diversa quantità degli ormoni dello stress nei due casi. In termini generali, i neonati nati da taglio cesareo sono meno protetti, con implicazioni negative sullo stato di salute a lunga distanza rispetto a quelli nati spontaneamente; in particolare, presentano un maggiore rischio di disturbi immunitari come allergie, asma, diabete di tipo 1 e obesità.

Meno male che esiste il latte materno. Gli autori anglofoni parlano a tal proposito di *rescue therapy*, terapia di salvataggio. Pertanto, un bambino nato da un taglio cesareo può comunque acquisire un buon microbiota intestinale grazie al latte della propria mamma, andando a influenzare positivamente l'esito del parto assistito.

La mamma gravida è di per sé una comunità, un tutt'uno con i propri batteri, quello che in termine scientifico si chiama "olobionte". In realtà nascere significa passare da un'associazione di organismi viventi (un consorzio simbiotico) ad un'altra associazione di organismi viventi. Ogni neonato inizia la sua vita fuori dall'utero con un corredo unico di batteri. Non esiste un microbiota di neonato identico a quello degli altri. Ciascuno di noi è un ecosistema unico!

I Bifidobatteri (genere batterico appartenente al phylum *Actinobacteria*) assumono particolare importanza in età pediatrica. Sono chiamati così perché molti presentano un aspetto bifido. Infatti, in condizioni fisiologiche, il microbiota intestinale di un neonato e di un lattante, fino allo svezzamento, è particolarmente ricco di Bifidobatteri, che possono rappresentare anche il 50% del totale del microbiota del neonato.

Questi batteri svolgono una serie di servizi utili al neonato. In primo luogo prevengono attivamente la colonizzazione dell'intestino da parte di "batteri cattivi", aiutando a stimolare e a sostenere il sistema immune. In secondo luogo, essi provvedono a garantire al neonato vitamine essenziali. I Bifidobatteri sono così numerosi nel piccolo paziente in quanto essenziali per metabolizzare gli oligosaccaridi del latte materno (*human milk oligosaccharides* – HMO) o, in loro assenza, i glicani presenti nella mucina, lo strato di muco che ispessisce la mucosa intestinale rendendola meno permeabile.

I Bifidobatteri sono ottimi batteri per la colonizzazione dell'intestino alla nascita.

Il confronto tra vecchi e attuali studi sul microbiota mette in evidenza una perdita recente di Bifidobatteri, che possono essere quasi considerati "*missing microbes*", batteri perduti, in relazione a un uso inappropriato di antibiotici e di latti formulati, a

un eccesso di igiene e a percentuali elevate di tagli cesarei.

Il latte materno è molto più che un cibo per il lattante! Oggi sappiamo che nel latte materno è presente una significativa quantità di batteri, un microbiota composto di 50 generi e 200 specie, che provengono da fonti interne ed esterne alla mammella. Si parla di MOM: *milk-oriented microbiota*.

In pratica, sono le nostre mamme a dotarci del primo microbiota durante il parto vaginale e a modularlo attraverso l'allattamento materno individualizzato. Tre quarti del microbiota umano deriva dalla madre, un "battesimo batterico" che può influenzare positivamente la nostra vita per sempre, proteggendoci da malattie come allergie, asma, celiachia, obesità. *Native core microbiota* è chiamata la dotazione iniziale di microrganismi che il neonato riceve dalla madre (durante il parto e l'allattamento) e dall'ambiente, e che rappresenta il fondamento del microbiota nelle età successive.

REFERENCES

- Fanos V. Metabolomica e microbiomica. La medicina personalizzata dal feto all'adulto. Quartu Sant'Elena: Hygeia Press, 2015.
- Fanos V. Dieta e microbiota. Alimenti, batteri, probiotici e salute. Quartu Sant'Elena: Hygeia Press, 2017.
- Fanos V. I batteri pionieri, pilastri della salute. Quartu Sant'Elena: Hygeia Press, 2021.
- Trapani G, Fanos V. Sano intestino, felice bambino. Intestino, cibo, batteri e benessere naturale. Quartu Sant'Elena: Hygeia Press, 2019.

LECT 3

BREASTFEEDING, WEANING AND HEALTHY GROWTH OF THE BABY [ALLATTAMENTO, SVEZZAMENTO E CRESCITA SANA DEL BAMBINO]

D.G. Peroni

Department of Clinical and Experimental Medicine, Section of Pediatrics, University of Pisa, Pisa, Italy

ENGLISH TEXT

The first 1,000 days after conception (the period of pregnancy and the first 2 years of life) are considered a "window of opportunity", and are essential for the development and health of the future adult. In fact, the fundamental steps for the establishment of the intestinal microbiota and the maturation of the immune system take place here. The physiological and immune development of the child and the establishment of the microbiota occur in parallel in this short period of time. The

developing microbiota plays a central role in the health process, intervening in the metabolic and immunological functions considered central to the host.

The factors that determine the development of the human microbiome are many and influence it from birth and over the following years. The neonatal microbiome is a delicate and highly dynamic ecosystem that undergoes rapid compositional changes in the first years of life determined by various pre- and peri-natal factors. The maturation of the gut microbiota to an adult-like structure largely occurs at the age of 2-3 years. Therefore, early childhood represents a critical period for modulating the microbiota in order to promote healthy growth and development [1].

The bidirectional interaction between the intestinal microbiota and the cells of the immune system represents a continuous growth of stimuli and impulses. Epithelial barrier cells, epithelial cells and dendritic cells “perceive” the microbiome through the expression of a large panel of receptors. In the state of health, these interactions are essential for maintaining local microbial homeostasis and the integrity of the epithelial barriers. This mechanism involves a variety of immune regulatory cells residing in the intestinal mucosa and molecules secreted by the epithelial layer. The resulting gut microbial community and metabolites contribute to the development of the host’s immune system, gut homeostasis and host metabolism. The Western lifestyle, with extensive use of antibiotics and other environmental triggers, can reduce the number of bacterial predators leading to a decrease in the microbial diversity of the human gut. This phenomenon is similar to the ecosystem depletion process in macroecology, where human activity decreases ecological niches, the size of predator populations and finally biodiversity [2].

The weaning period is also important for the development of the microbiota. The fecal microbiota of infants still breastfed is significantly different from that of infants already weaned, regardless of the age of introduction of solid foods. Among children still breastfed, there is a particular microbiota with a greater abundance of *Veillonella spp.* Babies no longer breastfed, on the other hand, have a more “mature” microbiota, with a significant increase in *Firmicutes* [3]. Weaning with infant cereals with 50% whole grains and reduced sugar content as the first weaning food compared to infant cereals made with refined flours has a significant effect on the composition of the fecal microbiota of 4-7-month-

old infants. This results in an increased presence of anaerobic fermenters along with a decrease in the abundance of the pathogen *Escherichia spp.* One study shows that the composition of the baby’s gut microbiota remains dynamic beyond 3 years of age and responds to dietary differences between individuals. Non-whole foods enriched with vitamins and minerals appear to be associated with the composition of the microbiome [4].

While environmental or other lifestyle changes remain largely unable to influence the clinic by the healthcare provider, diet remains a modifiable factor that can be used to prevent or mitigate disease risk and can be used to modify the course of the disease along with current standards of drugs and care devices. The diet creates and selects the microbiota from the early stages of life but continues to do so even during weaning and then again.

ITALIAN TEXT

I primi 1.000 giorni dopo il concepimento (il periodo di gravidanza e i primi 2 anni di vita) sono considerati una “finestra di opportunità”, e sono fondamentali per lo sviluppo e la salute del futuro adulto. Infatti, qui avvengono le tappe fondamentali per l’instaurazione del microbiota intestinale e la maturazione del sistema immunitario. Lo sviluppo fisiologico e immunitario del bambino e l’instaurazione del microbiota avvengono parallelamente in questo breve lasso di tempo. Il microbiota che si sta sviluppando svolge un ruolo centrale nel processo di salute, intervenendo nelle funzioni metaboliche e immunologiche considerate centrali dell’ospite.

I fattori che determinano lo sviluppo del microbioma umano sono molteplici e lo influenzano dalla nascita e nel corso degli anni successivi. Il microbioma neonatale è un ecosistema delicato e altamente dinamico che subisce rapidi cambiamenti di composizione nei primi anni di vita determinati da diversi fattori pre- e peri-natali. La maturazione del microbiota intestinale verso una struttura simile a quella di un adulto avviene in gran parte all’età di 2-3 anni. Pertanto, la prima infanzia rappresenta un periodo critico per modulare il microbiota al fine di promuovere una crescita e uno sviluppo sani [1]. L’interazione bidirezionale tra il microbiota intestinale e le cellule del sistema immunitario rappresenta una crescita continua di stimoli ed impulsi. Cellule della barriera epiteliale, cellule epiteliali e cellule dendritiche “percepiscono” il microbioma attraverso l’espressione di un ampio pannello di recettori. Nello stato di salute, tali interazioni sono essenziali per il mantenimento

dell'omeostasi microbica locale e dell'integrità delle barriere epiteliali. Questo meccanismo coinvolge una varietà di cellule immunitarie regolatrici residenti nella mucosa intestinale e di molecole secrete dallo strato epiteliale. La comunità microbica intestinale risultante e i metaboliti contribuiscono allo sviluppo del sistema immunitario dell'ospite, dell'omeostasi intestinale e del metabolismo dell'ospite. Lo stile di vita occidentale, con un ampio uso di antibiotici e altri fattori scatenanti ambientali, può ridurre il numero di predatori batterici portando a una diminuzione della diversità microbica dell'intestino umano. Questo fenomeno è simile al processo di impoverimento dell'ecosistema in macroecologia, dove l'attività umana diminuisce le nicchie ecologiche, la dimensione delle popolazioni di predatori e infine la biodiversità [2].

L'epoca dello svezzamento è poi importante per lo sviluppo del microbiota. Il microbiota fecale di bambini ancora allattati al seno è significativamente diverso da quello dei bambini già svezzati, indipendentemente dall'età di introduzione degli alimenti solidi. Tra i bambini ancora allattati al seno vi è un microbiota particolare con maggiore abbondanza di *Veillonella spp.* I bambini non più allattati al seno possiedono invece un microbiota più "maturo", con notevole incremento di *Firmicutes* [3]. Lo svezzamento con cereali per lattanti con il 50% di cereali integrali e contenuto di zucchero ridotto come primo alimento per lo svezzamento, rispetto ai cereali per lattanti prodotti con farine raffinate, ha un effetto significativo sulla composizione del microbiota fecale dei lattanti di 4-7 mesi. Questo comporta una maggiore presenza di fermentatori anaerobici insieme a una diminuzione dell'abbondanza del patogeno *E. coli*. Uno studio dimostra che la composizione del microbiota intestinale del bambino rimane dinamica oltre i 3 anni di età e risponde alle differenze dietetiche tra gli individui. In particolare, gli alimenti non integrali arricchiti con vitamine e minerali sembrano essere associati alla composizione del microbioma [4].

Mentre i cambiamenti dello stile di vita e quelli ambientali rimangono in gran parte elementi su cui l'operatore sanitario difficilmente può intervenire con scelte cliniche, la dieta rimane un fattore modificabile che può essere utilizzato per prevenire o mitigare il rischio di malattia e può essere impiegato per modificare il decorso della malattia insieme agli attuali standard di farmaci e dispositivi di cura. La dieta crea e seleziona il microbiota dalle prime fasi della vita, ma continua a farlo anche durante lo svezzamento e oltre.

REFERENCES

- [1] Peroni DG, Nuzzi G, Trambusti I, Di Cicco ME, Comberlati P. Microbiome Composition and Its Impact on the Development of Allergic Diseases. *Front Immunol.* 2020;11:700.
- [2] Mosca A, Leclerc M, Hugot JP. Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Front Microbiol.* 2016;7:455.
- [3] Matsuyama M, Gomez-Arango LF, Fukuma NM, Morrison M, Davies PSW, Hill RJ. Breastfeeding: a key modulator of gut microbiota characteristics in late infancy. *J Dev Orig Health Dis.* 2019;10(2):206-13.
- [4] Plaza-Diaz J, Bernal MJ, Schutte S, Chenoll E, Genovés S, Codoñer FM, Gil A, Sanchez-Siles LM. Effects of Whole-Grain and Sugar Content in Infant Cereals on Gut Microbiota at Weaning: A Randomized Trial. *Nutrients.* 2021;13(5):1496.

LECT 4

THE ROLE OF GUT MICROBIOTA AND PROBIOTICS SUPPLEMENTATION IN THE MANAGEMENT OF INFANTILE COLIC [IL RUOLO DEL MICROBIOTA INTESTINALE E DELL'INTEGRAZIONE PROBIOTICA NELLA GESTIONE DELLE COLICHE INFANTILI]

M. Romeo

Department of Biology and Biotechnology, University of Pavia, Pavia, Italy

ENGLISH TEXT

Infantile colic is one of the most common disorders in children, affecting 10-30% of babies in their first months of life. It manifests as excessive and painful involuntary contractions of muscles in the intestinal wall that significantly affect the child's well-being. Infantile colic – as referenced in the new Rome IV Diagnostic Criteria – has been recently considered as one of the functional gastrointestinal disorders (FGID) in infants.

Although the etiopathogenesis is not yet fully understood, several factors have been implicated in its onset: psychosocial causes, central nervous system (CNS) alterations, gastrointestinal problems such as gastroesophageal reflux (GERD), cow's milk allergy, disorders of intestinal motility and alterations in the biodiversity of the intestinal microbiota.

In the last decade, studies on the gut microbiota have made it possible for us to put forward the hypothesis of a potential role of the intestinal ecosystem in the pathophysiology of infantile colic. In fact, it has been suggested that an alteration in the biodiversity of the intestinal microbiota may affect motility and gas production, contributing to the onset of colic.

Recent studies confirm, in fact, the presence of significant alterations of the intestinal microbial ecosystem in children with colic in terms of microbial biodiversity, stability and intestinal colonization status.

These alterations indicate that a state of intestinal dysbiosis, defined as a microbial imbalance in the gastrointestinal tract, may play a role in the onset of infantile colic.

In particular, De Weerth and coworkers analyzed fecal samples from 12 infants with colic and 12 infants without colic, highlighting a lower diversity and stability of the intestinal microbiota in infants with colic compared to infants without colic during the first 2 weeks of life, with a greater relative abundance of proteobacteria (*Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Vibrio spp.*, *Yersinia spp.* and *Pseudomonas spp.*) and reduction of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*.

Intestinal dysbiosis could contribute to colic symptoms by increasing the fermentation of lactose, carbohydrates and proteins resulting in increased gas production and intestinal distention. The alteration of the microbiota and the consequent increase in intestinal permeability would also be associated with greater inflammation of the mucosa. Intestinal inflammation could be caused by an increase in the number of Gram-negative bacteria, including *Escherichia spp.*, *Bacteroidetes spp.* and *Klebsiella spp.* The pathogen-associated lipopolysaccharide, present on the outer membranes of Gram-negative bacteria, can promote the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. These, in turn, cause a pro-inflammatory response in intestinal epithelial cells with repercussions on the gut-brain axis, contributing to the onset of colic and crying.

With regards to the evidence of a correlation between infantile colic and intestinal dysbiosis, it seems plausible to include probiotics in their therapeutic management.

The intestinal colonization of beneficial bacteria, such as *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*, has already shown in previous studies to be able to act positively on various gastrointestinal problems frequently found in children.

In particular, one study has shown that the administration of probiotics in the early stages of life could prevent the onset of functional gastrointestinal symptoms.

The mechanism of the actions of probiotics in this area has not been fully clarified, but they appear to be mediated by the activity of the colon on the intrinsic sensory neurons resulting in improved

intestinal motility, as well as having positive effects on visceral function and pain.

Probiotics have been shown to have anti-inflammatory properties and to inhibit the growth of coliforms, frequently found in colicky children, through the production of bacteriocins and final fermentation products such as short-chain fatty acids (SCFA).

Supplementation with specific probiotic bacterial species can be considered effective for the treatment of colic by inducing changes in the microbial ecosystem and intestinal pH.

In particular, a randomized, double-blind, placebo-controlled study was recently conducted on women in physiological pregnancy, with the aim of verifying the effectiveness of the prenatal administration of *L. reuteri* LR92 DSM 26866 at the onset of infantile colic. The study was carried out on 145 pregnant women divided into two groups: 74 women subjected to daily administration of 1×10^8 colony-forming units of *L. reuteri* LR92 DSM 26866 in the last 4 weeks of pregnancy; the second group of 71 women who received placebo in the last 4 weeks of pregnancy.

Babies born to both groups of women were followed for 5 months to assess the onset of colic and their grading. The study showed a reduction in the amount of colic in infants born to mothers receiving the probiotic compared to placebo and a reduction in the frequency and grading of colic in the probiotic group compared to the placebo group. Researchers concluded that maternal prenatal supplementation of the probiotic *L. reuteri* LR92 DSM 26866 during the last 4 weeks of pregnancy can prevent the onset and reduce the severity of infant colic.

L. reuteri is a heterofermentative bacterial species that has been shown to actively colonize the gastrointestinal tract, genitourinary tract, skin and breast milk.

Several studies have revealed that its use as a probiotic bacterium is well tolerated, safe and effective in both adults and infants.

In vitro and *in vivo* studies show that *L. reuteri* is able to promote, through multiple means, human health.

In particular, *L. reuteri* fights infections due to its ability to produce reuterin, a well-known antimicrobial compound capable of inhibiting various pathogenic microorganisms.

Recent studies also show that it produces many other antimicrobial substances, including lactic acid, acetic acid, ethanol and reutericycline, which are effective against various bacterial gastrointestinal infections.

Some strains of *L. reuteri* are able to convert the amino acid L-histidine into a histamine that is capable of suppressing the production of TNF (tumor necrosis factor) because of the activation of the histamine H₂ receptor, the increase in intracellular cAMP and protein kinase A.

Other studies show that this probiotic strain enhances the absorption of nutrients, minerals and vitamins, including vitamin B12 and folate, modulates host immune responses, intestinal mucosal integrity and counteracts bacterial translocation.

ITALIAN TEXT

Le coliche infantili sono uno dei disturbi più comuni in età pediatrica, che colpiscono il 10-30% dei bambini nei primi mesi di vita. Si tratta di contrazioni eccessive e dolorose della muscolatura involontaria della parete intestinale, che influenzano in maniera significativa il benessere del bambino.

Recentemente, in relazione ai nuovi Criteri di Roma IV, le coliche infantili rientrano tra i disturbi gastrointestinali funzionali (FGID) dell'infanzia.

Nonostante l'etiopatogenesi non sia ancora del tutto chiara, diversi fattori sono stati implicati nella loro insorgenza: cause psicosociali, alterazioni del sistema nervoso centrale (SNC), problematiche gastrointestinali come il reflusso gastroesofageo (GERD), l'allergia al latte vaccino, disturbi della motilità intestinale e alterazioni della biodiversità del microbiota intestinale.

Nell'ultimo decennio, gli studi sul microbiota hanno consentito di avanzare l'ipotesi di un potenziale ruolo dell'ecosistema intestinale nella fisiopatologia delle coliche infantili. È stato suggerito, infatti, che un'alterazione della biodiversità del microbiota intestinale possa influenzare la motilità e la produzione di gas contribuendo all'insorgenza delle coliche.

Studi recenti confermano, infatti, la presenza di alterazioni significative dell'ecosistema microbico intestinale nei bambini con coliche in termini di biodiversità microbica, stabilità e stato di colonizzazione intestinale. Queste alterazioni indicano che uno stato di disbiosi intestinale, definita come uno squilibrio microbico nel tratto gastrointestinale, possa avere un ruolo nell'insorgenza delle coliche infantili.

In particolare, De Weerth e colleghi hanno analizzato i campioni fecali di 12 neonati con coliche e 12 neonati senza coliche evidenziando una minore diversità e stabilità del microbiota intestinale nei bambini con coliche rispetto ai bambini senza coliche durante le prime 2 settimane di vita, con una maggiore abbondanza relativa di proteobatteri

(*Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Vibrio spp.*, *Yersinia spp.* e *Pseudomonas spp.*) e riduzione di Bifidobatteri e Lattobacilli.

La disbiosi intestinale potrebbe contribuire ai sintomi delle coliche aumentando la fermentazione di lattosio, carboidrati e proteine con conseguente aumento della produzione di gas e distensione intestinale. L'alterazione del microbiota e il conseguente aumento della permeabilità intestinale sarebbero anche associati ad una maggiore infiammazione della mucosa. L'infiammazione intestinale potrebbe derivare da un aumento della quantità di batteri Gram-negativi, tra cui *Escherichia spp.*, *Bacteroidetes spp.* e *Klebsiella spp.* Il lipopolisaccaride associato ai patogeni, presente sulle membrane esterne dei batteri Gram-negativi, può promuovere la produzione di citochine e chemochine proinfiammatorie, provocando di conseguenza una risposta proinfiammatoria nelle cellule epiteliali intestinali con ripercussioni sull'asse intestino-cervello, contribuendo all'insorgenza delle coliche e del pianto.

In relazione all'evidenza di una correlazione tra coliche infantili e stato di disbiosi intestinale, appare plausibile inserire nella loro gestione terapeutica i probiotici.

La colonizzazione intestinale di batteri benefici, come *Lactobacilli* e Bifidobatteri, ha già dimostrato, in precedenti studi, di poter intervenire nel migliorare diverse problematiche gastrointestinali di frequente riscontro in età pediatrica. In particolare, uno studio ha dimostrato che la somministrazione di probiotici nelle prime fasi della vita potrebbe prevenire l'insorgenza di sintomi funzionali gastrointestinali. Il meccanismo d'azione dei probiotici in questo ambito non è stato del tutto chiarito, ma sembra essere mediato dall'attività sui neuroni sensoriali intrinseci del colon con un miglioramento della motilità intestinale, oltre ad avere effetti positivi sulla funzione e sul dolore viscerale.

I probiotici hanno mostrato proprietà antinfiammatorie e la capacità di inibire la crescita dei coliformi, frequentemente riscontrati nei bambini colici, attraverso la produzione di batteriocine e prodotti di fermentazione finali come gli acidi grassi a corta catena (SCFA).

L'integrazione di specifiche specie batteriche probiotiche può essere ritenuta efficace per il trattamento delle coliche inducendo cambiamenti nell'ecosistema microbico e del pH intestinale.

In particolare, di recente è stato condotto uno studio randomizzato in doppio cieco, controllato con placebo, su donne in gravidanza fisiologica, con l'obiettivo di verificare l'efficacia della som-

ministrazione prenatale di *L. reuteri* LR92 DSM 26866 sull'insorgenza di coliche infantili. Lo studio è stato condotto su 145 donne gravide suddivise in due gruppi: 74 donne sottoposte a somministrazione giornaliera di 1×10^8 unità formanti colonie di *L. reuteri* LR92 DSM 26866 nelle ultime 4 settimane di gravidanza; il secondo gruppo di 71 donne che hanno ricevuto il placebo nelle ultime 4 settimane di gravidanza.

I bambini nati da entrambi i gruppi di donne sono stati seguiti per 5 mesi per valutare l'insorgenza di coliche e il loro *grading*. Lo studio ha mostrato una riduzione del numero di coliche nei neonati nati da madri sottoposte a somministrazione del probiotico rispetto al placebo e una riduzione della frequenza e del *grading* della colica nel gruppo probiotico rispetto al gruppo placebo.

I ricercatori hanno concluso che la supplementazione prenatale materna del probiotico *L. reuteri* LR92 DSM 26866 durante le ultime 4 settimane di gravidanza può prevenire l'insorgenza e ridurre la gravità delle coliche infantili.

Il *L. reuteri* è una specie batterica eterofermentativa che ha dimostrato di colonizzare attivamente il tratto gastrointestinale, il tratto genitourinario, la pelle e il latte materno.

Diversi studi hanno rivelato che il suo impiego come batterio probiotico è ben tollerato, sicuro ed efficace sia negli adulti che nei neonati. Studi *in vitro* e *in vivo* mostrano che il *L. reuteri* è in grado di contribuire alla salute dell'uomo attraverso molteplici azioni. In particolare, il *L. reuteri* contrasta le infezioni grazie alla capacità di produrre la reuterina, un noto composto ad azione antimicrobica capace di inibire diversi microrganismi patogeni.

Studi recenti mostrano, altresì, che produce molte altre sostanze antimicrobiche, tra cui acido lattico, acido acetico, etanolo e reutericina efficaci contro diverse infezioni batteriche gastrointestinali. Alcuni ceppi di *L. reuteri* sono in grado di convertire l'amminoacido L-istidina in istamina capace di sopprimere la produzione di TNF (*tumor necrosis factor*) grazie all'attivazione del recettore H₂ dell'istamina e all'aumento del cAMP intracellulare e della protein-chinasi A. Altri studi mostrano che questo ceppo probiotico migliora l'assorbimento di nutrienti, minerali e vitamine, tra cui vitamina B12 e folati, modula le risposte immunitarie dell'ospite e l'integrità della mucosa intestinale e contrasta la traslocazione batterica.

REFERENCES

- Ahanchian H, Javid A. Prevention of Infantile Colic Using Probiotics. *EMJ Gastroenterol.* 2018;7(1):120-7.

- De Weerth C, Fuentes S, Puylaert P, de Vos WM. Intestinal microbiota of infants with colic: development and specific signatures. *Pediatrics.* 2013;13:e550-8.
- Pourmirzaiee MA, Famouri F, Moazeni W, Hassanzadeh A, Hajhashemi M. The efficacy of the prenatal administration of *Lactobacillus reuteri* LR92 DSM 26866 on the prevention of infantile colic: a randomized control trial. *Eur J Pediatr.* 2020;179(10):1619-26.
- Yang Y, Zhao X, Le MH, Zijlstra RT, Ganzle MG. Reutericyclin producing *Lactobacillus reuteri* modulates development of fecal microbiota in weanling pigs. *Front Microbiol.* 2015;6:762.
- Zeevenhooven J, Koppen IJN, Benninga MA. The New Rome IV Criteria for Functional Gastrointestinal Disorders in Infants and Toddlers. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2017;20(1):1-13.

LECT 5

A JOURNEY INTO THE MICROBIOTA AMONG ALLERGIES AND IMMUNE SYSTEM DISEASES [VIAGGIO NEL MICROBIOTA TRA ALLERGIE E MALATTIE DEL SISTEMA IMMUNITARIO]

R. Castagnoli, G.L. Marseglia

Pediatric Clinic, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy

Department of Clinical, Surgical, Diagnostic and Pediatric Sciences, University of Pavia, Pavia, Italy

ENGLISH TEXT

Intestinal homeostasis is driven by the mutual interaction between the microbiota and the host immune system [1]. Gut microbiota has a crucial function in affecting the development of the host's immune system, which in turn models the microbiota constitution and favors the preservation of host-microbe symbiosis [2]. In genetically susceptible hosts, alterations in the microbiota-immunity interplay participate to the pathogenesis of immune-mediated diseases [3]. In this context, the investigation of gut microbiota-host interactions in inborn errors of immunity (IEI) may facilitate the understanding of the factors involved in the maintenance of intestinal homeostasis. IEI are a group of diseases that are mostly caused by genetic mutations affecting host defense immunity and immune regulation [4]. The clinical spectrum of IEI is extraordinary broad and includes recurrent infections, autoimmunity, lymphoproliferation, atopy, inflammatory manifestations, and malignancy [4]. Here, through a translational approach, we focus on the interactions between gut microbiota and immunity in IEI.

The emergence of “-omics” technologies, including metatranscriptomics, shotgun metagenomics and metabolomics, has created a large amount

of sophisticated data to analyze the microbiome composition and the host immune responses more thoroughly, overall allowing for the identification of distinct immunopathological signatures as well as therapeutic strategies. While a limited number of studies on the microbiome in IEI patients is currently available, interest in this field is rising rapidly [5]. Through the study of IEI, it is possible to dissect which cells and molecular mechanisms are crucial for immune responses at barrier sites as well as non-redundant pathways necessary for gut colonization by commensal microbes. A common feature of the microbiome in IEI patients is the reduction in microbial species characteristically associated with health. In healthy conditions, commensal microbes can limit the growth of disease-causing bacteria and promote immunological mechanisms to block competing microbial species, overall eliciting responses that preserve the integrity of the epithelial barriers. Disruptions of these interactions may drive aberrant immunity in IEI. Nonetheless, independent, ideally larger and longitudinal studies are necessary to corroborate these findings. Taking into account possible confounders such as age, sex, diet, treatment, socioeconomic features, geographical location, and gastrointestinal symptoms is especially challenging, yet fundamental, in studies that aim to distinguish genetic factors from environmental influences. Importantly, IEI patients often need anti-microbial treatments to prevent or manage recurrent or chronic infection. The impact of long-term antibiotic usage on the diversity of the human microbiota is not completely understood, in particular in regard to immune dysregulation. Lastly, considering the association between gut microbiota composition and disease burden in IEI, the application of therapeutic measures to target intestinal dysbiosis may be promising. Manipulating gut microbiota, through pharmacologic modification/decontamination or fecal microbiota transplantation, can shape the microbiota composition, depleting disease-causing bacteria and/or replenishing missing health microbes, overall promoting gut homeostasis. Nevertheless, to harness the gut microbiota as a therapeutic target and tool, it is critical to comprehensively understand microbiota-host interactions in IEI patients and clearly substantiate the effectiveness and safety of these procedures.

ITALIAN TEXT

L'omeostasi intestinale è determinata dalla reciproca interazione tra il microbiota e il sistema immunitario dell'ospite [1]. Il microbiota intestinale ha una funzione fondamentale nell'influenzare lo sviluppo

del sistema immunitario dell'ospite, che a sua volta modella la costituzione del microbiota e promuove la simbiosi tra l'ospite e il suo microbiota [2]. In soggetti geneticamente predisposti, le alterazioni del mutualistico rapporto tra microbiota e sistema immunitario contribuiscono alla patogenesi delle malattie immunomediate [3]. In questo contesto, lo studio delle interazioni microbiota-ospite nell'ambito degli errori innati dell'immunità (*inborn errors of immunity* – IEI) può facilitare la comprensione dei fattori coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi intestinale. L'acronimo IEI contrassegna un gruppo di malattie causate da mutazioni genetiche che alterano il normale funzionamento del sistema immunitario dell'ospite [4]. Lo spettro clinico delle IEI è straordinariamente ampio e comprende infezioni ricorrenti, autoimmunità, linfoproliferazione, allergie, manifestazioni infiammatorie e predisposizione a patologie neoplastiche [4]. La presente trattazione analizza le interazioni tra microbiota intestinale e immunità nelle IEI.

L'emergere di tecnologie "omiche", tra cui la metatrascrittomica, la metagenomica e la metabolomica, ha permesso di generare una grande quantità di dati complessi per analizzare in modo sempre più approfondito le interazioni tra il microbiota intestinale e l'immunità nelle IEI, consentendo nel complesso l'identificazione di specifici meccanismi immunopatologici e lo sviluppo di strategie terapeutiche. Sebbene sia attualmente disponibile un numero limitato di studi sul microbioma dei pazienti affetti da IEI, l'interesse in questo campo sta aumentando rapidamente [5]. Attraverso lo studio di IEI, è possibile individuare le cellule e i meccanismi molecolari cruciali per la risposta immunitaria a livello mucosale e i *pathways* essenziali per la colonizzazione dell'intestino da parte dei microbi commensali. Una caratteristica comune del microbiota dei pazienti con IEI è la riduzione delle specie microbiche che caratterizzano il microbiota dei soggetti sani. In condizioni di salute, i microbi commensali possono limitare la crescita dei batteri che causano malattie e promuovere meccanismi immunologici per bloccare le specie microbiche concorrenti. La mancanza di queste interazioni positive può aggravare la già aberrante risposta immunitaria delle IEI. Tuttavia, sono necessari studi con coorti più numerose e con analisi longitudinali nel tempo, per corroborare questi risultati. Tenere conto di possibili fattori confondenti come età, sesso, dieta, trattamento, caratteristiche socioeconomiche, provenienza geografica e sintomi gastrointestinali è particolarmente impegnativo, ma

fondamentale, negli studi che mirano a distinguere i fattori genetici dalle influenze ambientali. È importante notare che i pazienti affetti da IEI spesso necessitano di trattamenti antimicrobici per prevenire o trattare infezioni ricorrenti o croniche. L'impatto dell'uso a lungo termine di antibiotici sulla diversità del microbiota umano non è completamente definito. Infine, considerando l'associazione tra la composizione del microbiota intestinale e la gravità della malattia nelle IEI, l'applicazione di misure terapeutiche per contrastare la disbiosi intestinale può essere promettente. La manipolazione del microbiota intestinale, attraverso la modifica/decontaminazione farmacologica o il trapianto di microbiota fecale, può modellare la composizione del microbiota, limitando lo sviluppo dei batteri che causano la malattia e/o reintegrando i batteri commensali, promuovendo nel complesso l'omeostasi intestinale. Tuttavia, per sfruttare il microbiota intestinale come bersaglio e strumento terapeutico, è fondamentale comprendere a fondo le interazioni microbiota-ospite nei pazienti con IEI e dimostrare chiaramente l'efficacia e la sicurezza di queste procedure.

REFERENCES

- [1] Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012;336(6086):1268-73.
- [2] Castagnoli R, Giovannini M, Riggioni C. The role of the microbiota in the development of thymic-derived specific T-cells. *Allergy*. 2022;77(4):1328-30.
- [3] Uhlig HH. Monogenic diseases associated with intestinal inflammation: implications for the understanding of inflammatory bowel disease. *Gut*. 2013;62(12):1795-805.
- [4] Castagnoli R, Delmonte OM, Notarangelo LD. Congenital and acquired defects of immunity: An ever-evolving story. *Pediatr Allergy Immunol*. 2022;33(Suppl 27):61-4.
- [5] Castagnoli R, Pala F, Bosticardo M, Licari A, Delmonte OM, Villa A, Marseglia GL, Notarangelo LD. Gut Microbiota-Host Interactions in Inborn Errors of Immunity. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1416.

LECT 6

WHAT IS EVIDENT IN METABOLIC DISORDERS: OBESITY, DIABETES AND MICROBIOTA [EVIDENZE NEI DISORDINI METABOLICI: OBESITÀ, DIABETE E MICROBIOTA]

G. Banderali

Clinical Department of Neonatology and Pediatrics, San Paolo Hospital, ASST Santi Paolo e Carlo, Milan, Italy

ENGLISH TEXT

Our body contains at least 1,000 different species of bacteria (approximately are estimated 10^{13} - 10^{14}

microbial cells) with a 1:1 ratio of microbial to human cells [1].

When microbial communities coexist in a symbiotic way within a specific habitat capable of actively participating in the maintenance of an adequate metabolic, biochemical and immune balance, or capable of bringing well-being and health to the organism guest, the condition can be called "eubiosis". On the contrary, in the case of imbalances between different bacteria or species and/or loss of diversity, we call it "dysbiosis", which relates to various diseases.

Intestinal microbiota composition is the result of a long-going process that begins during the fetal period, then is modified by the type of birth and breastfeeding and continues to evolve throughout life (with numerous contributing factors such as the type of diet, sleep, ambient temperature, presence of pets, exposure to cigarette smoke, etc.).

Intestinal microbiota in obese people is already known to be altered. At the same time an altered microbiota in the pediatric age is described to be associated with the development of obesity and related complications in adulthood (cardiovascular disease, diabetes, atherosclerosis, metabolic syndrome, NAFLD, etc.).

Mainly, in the obesogenic microbiota there is an alteration of the two dominant phyla, that is, the abundance of *Firmicutes* (increased) and *Bacteroidetes* (decreased). The altered microbiota of an overweight/obese subject also shows a reduction of the *A. muciniphila*, whose main contributions are to offer protection against excessive accumulation of adipose tissue, its inflammation and accelerate insulin resistance.

To date, scientific evidence suggests that the integration of *L. plantarum*, *B. breve* and *L. acidophilus* may improve to re-establish the correct *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, decreasing body weight and improving some plasma parameters such as HDL cholesterol, triglycerides and glycated hemoglobin. In type 2 diabetes mellitus, similar dysbiosis is described, predisposing to an increase in intestinal permeability and cytokines, chemokines and pro-inflammatory proteins. The therapeutic target in this pathology is therefore to re-establish intestinal permeability and modulate inflammation and glucose and lipid metabolism, thus studies are focusing on some bacteria having these abilities (for example *Bact. vulgatus* and *dorei* are studied and applied for their potential to increase the genes involved in intestinal tight junctions, *A. muciniphila* for the synthesizing of occludin, *B. lactis* for

its potential to increase glycogen synthesis thus reducing fasting glycemia [2], etc.).

The intestinal bacterial footprint of patients with type 1 diabetes mellitus, on the other hand, shows changes capable of destroying the β cells of the islets through molecular mimicry, excessive activation of innate immunity and adaptive immunity. The experimental studies conducted therefore seek to subvert this process: the fecal microbiota transplant, for example, has brought significant benefits, supporting the integrity of pancreatic β cells and, consequently, the production of endogenous insulin [3].

Infant, children and adolescents have a microbiota that is still building and still highly and easily influenced. As a consequence in these subjects the risk of developing pathologies related to intestinal dysbiosis is even higher. Nutrition certainly represents an important prevention weapon, aimed at ensuring a correct state of health at any age: in particular, it is able to positively modulate the host's microbiota and potentially reduce non-communicable diseases.

ITALIAN TEXT

Sono almeno 1.000 le diverse specie di batteri contenute nel corpo umano (stima di circa 10^{13} - 10^{14} cellule microbiche), con un rapporto di 1:1 tra cellule microbiche e cellule umane [1].

Ove tali comunità microbiche convivano in modo simbiotico tra loro e con l'ospite all'interno di uno specifico habitat in grado di partecipare attivamente al mantenimento di un adeguato bilancio metabolico, biochimico e immunitario, ovvero in grado di apportare benessere e salute all'organismo ospite, si parla di "eubiosi". Al contrario, in caso di squilibri tra i diversi batteri o specie e/o perdita di diversità si parla di "disbiosi", correlata a diverse patologie.

La composizione del microbiota intestinale è il risultato di un processo in continua evoluzione che inizia ad essere plasmato sin dall'epoca fetale, modificato poi dal tipo di parto e allattamento, e in continua modifica per tutte le fasi della vita (fattori contribuenti la composizione sono ad esempio il tipo di dieta, la qualità del sonno, la temperatura ambientale, l'eventuale presenza di animali domestici, l'esposizione al fumo di sigaretta, etc.).

Ad oggi si può affermare con sicurezza che la composizione del microbiota intestinale nelle persone affette da obesità risulta alterata e, allo stesso tempo, che un microbiota alterato in epoca pediatrica risulta associato allo sviluppo non solo di obesità ma anche delle complicanze ad essa collegate in età adulta (malattie cardiovascolari,

diabete, aterosclerosi, sindrome metabolica, NAFLD, etc.).

Principalmente, nel microbiota obesogeno si assiste all'alterazione dei due phyla dominanti, ovvero a un'aumentata abbondanza di *Firmicutes* e ad una riduzione di *Bacteroidetes*. Il microbiota alterato di un soggetto in sovrappeso/obeso, inoltre, mostra anche una riduzione della specie *A. muciniphila*, le cui azioni principali si contestualizzano nell'offrire protezione contro l'eccessivo accumulo di tessuto adiposo, l'infiammazione del tessuto adiposo e l'insulino-resistenza.

Ad oggi le evidenze scientifiche suggeriscono che l'integrazione di *L. plantarum*, *B. breve* e *L. acidophilus* possono essere in grado di migliorare il rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*, ridurre il peso corporeo e migliorare alcuni parametri plasmatici come colesterolo HDL, trigliceridi ed emoglobina glicata. Nel diabete mellito di tipo 2 si assiste a una disbiosi simile, in grado di predisporre ad un aumento della permeabilità intestinale nonché possibile aumento di citochine, chemochine e proteine proinfiammatorie. Il target terapeutico in questa patologia è quindi quello di ristabilire la permeabilità intestinale e modulare l'infiammazione e il metabolismo glucidico e lipidico, per cui gli studi ad oggi si concentrano su alcuni batteri con queste capacità (ad esempio, i *Bact. vulgatus* e *dorei* sono studiati e applicati in quanto sembrano in grado di aumentare i geni coinvolti nelle giunzioni strette intestinali, l'*A. muciniphila* di sintetizzare l'occludina, il *B. lactis* di aumentare la sintesi di glicogeno e quindi ridurre la glicemia a digiuno, etc. [2]).

L'impronta batterica intestinale dei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1 evidenzia invece cambiamenti in grado di distruggere le cellule β del pancreas attraverso mimetismo molecolare, eccessiva attivazione dell'immunità innata e immunità adattiva. Gli studi sperimentali (in ambito di microbiota) cercano quindi di sovvertire questo processo: il trapianto di microbiota fecale, ad esempio, sembra in grado di apportare notevoli benefici, sostenendo l'integrità delle cellule β pancreatiche e, di conseguenza, la produzione di insulina endogena [3].

In età pediatrica il microbiota risulta ancora in netta via di sviluppo, quindi ancora fortemente influenzabile, di conseguenza il rischio di sviluppare patologie legate alla disbiosi intestinale può risultare maggiorato. L'alimentazione, in questo contesto, costituisce un'arma importante di prevenzione, volta ad assicurare un corretto stato

di salute in qualsiasi età, in particolare modulando positivamente il microbiota dell'ospite per ridurre le patologie non trasmissibili.

REFERENCES

- [1] Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533.
- [2] Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med.* 2018;50(8):1-9.
- [3] Ianiro G, Gasbarrini A, Cammarota G. Autologous faecal microbiota transplantation for type 1 diabetes: a potential mindshift in therapeutic microbiome manipulation? *Gut.* 2021;70(1):2-3.

LECT 7

THE KNOWLEDGE OF THE MICROBIOTA IN PRIMARY CARE [I RISVOLTI PRATICI DELLE CONOSCENZE SUL MICROBIOTA]

G. Trapani¹, G. Maiocco², A. Spadavecchia²

¹Alfred Nobel International Association Studies Center, Sanremo, Italy

²Department of Public Health and Pediatric Sciences of the University, City of Health and Science of Turin, Turin, Italy

ENGLISH TEXT

The human well-being can be considered as a puzzle made up of 37.2 trillion (10^{12}) pieces, which are the cells of the human body all connected and in homeostasis to each other. The microbiota is part of this puzzle. Each individual is equipped with a microbial fingerprint, the core microbiota, with bacteria, viruses, fungi, and parasites that live not only in the intestine but throughout the body (lung, skin, urogenital system). The composition of this microbiota depends on a person's lifestyle, age, diet and environment of life.

In the context of a healthy microbiota, nutrition is pivotal. In particular, a traditional and eco-sustainable Mediterranean diet with its richness in fibers increases the quantity of *Bacteroides* and *Actinobacteria* in the intestine and reduces *Firmicutes* and *Proteobacteria*. These species of bacteria increase the production of short-chain fatty acids (acetate, propionate and butyrate) and are capable of modulating the immune response, especially in the lungs (reduction of Th-2 and eosinophils) [1].

There is therefore a link between the composition, the activity of the intestinal microbiota, health and disease also in the child. The modulation of the intestinal microbiota through the administration of probiotics is important for diseases prevention and must be done starting from pregnancy to help the

correct development of many organs and systems such as the neural, immune and gastrointestinal systems [2].

Gestational age, type of delivery (cesarean or natural), maternal type of diet, treatment with antibiotics, the environment can influence the pattern of bacterial colonization in the newborn and cause dysbiosis. The first 1,000 days of life are important for health and illness firstly during childhood and later during adulthood. The metabolites that come directly from the maternal diet are further processed by the mother's microbiota: those metabolites are then transferred to the fetus *in utero* through the placenta and to the newborn after delivery through the mother's milk. Their role is very important in affecting the immune system of the child since the first stages of life. Furthermore, the placental microbiota can trigger immune responses in the fetus and program the baby's immune development during fetal and then neonatal life.

The transmission of metabolic and allergic diseases from mother to child is multifactorial and includes genetic, epigenetic and environmental influences. Maternal obesity and Western diet affect the production of metabolites, alter the intestinal barrier and hematopoietic immune cells. A dysbiosis in this period can have long-lasting functional effects, increasing the risk of disease (allergy, obesity) in childhood and adulthood. The use of good quality probiotics is able to prevent dysbiosis [3, 4].

Probiotics can also have a preventive effect on respiratory tract infections. Several studies have shown that there may be a protective effect if probiotic supplementation is associated with high adherence to the Mediterranean diet during pregnancy. This also improves asthma symptoms and atopic disease in childhood. However, early intestinal dysbiosis (during neonatal and early childhood) with less microbial diversity or early colonization with opportunistic species has been associated with an increased risk of asthma. While *L. rhamnosus* has shown a role in the reduction of duration of infections, other upper respiratory tract bacteria, such as *Bifidobacteria*, *L. casei* (or *L. paracasei subsp. paracasei*), *L. reuteri* and *L. acidophilus*, have shown moderate efficacy [5].

However, to assure a healthy outcome in patients high quality probiotics can't be administered alone, but they have to be associated with and strengthened by other preventive factors, such as diet and lifestyle.

ITALIAN TEXT

Lo stato di salute può essere considerato come un puzzle composto da 37,2 bilioni (10^{12}) di tessere,

che sono le cellule del corpo umano, tutte connesse quando sono in omeostasi tra loro. Il microbiota è una parte di questo puzzle. Ogni individuo è fornito di una dotazione di germi base, il *core microbiota*, con i suoi batteri, virus, funghi, e parassiti che vivono non solo nell'intestino ma in tutto il corpo (polmone, cute, apparato urogenitale) e dipendono da: stile di vita, età del soggetto, alimentazione ed ambiente in cui vive.

La nutrizione è fondamentale, in particolare una dieta mediterranea tradizionale ed ecosostenibile con la sua ricchezza di fibre aumenta la quantità di *Bacteroides* e *Actinobacteria* a livello intestinale e riduce *Firmicutes* e *Proteobacteria*, aumentando la produzione di acidi grassi a corta catena (acetato, propionato e butirato) e modulando la risposta immunitaria a livello polmonare (riduzione dei Th-2 e degli eosinofili) [1].

Esiste quindi un legame tra la composizione, l'attività del microbiota intestinale, la salute e la malattia anche nel bambino.

La modulazione del microbiota intestinale attraverso la somministrazione di probiotici è importante nella prevenzione delle malattie e deve essere fatta a partire dalla gravidanza per aiutare il corretto sviluppo di molti organi e sistemi come quello nervoso, immunitario e gastrointestinale [2].

In seguito l'età gestazionale, le modalità del parto (cesareo o naturale), il tipo di alimentazione, il trattamento con antibiotici, l'ambiente possono influenzare il modello di colonizzazione batterica e provocare disbiosi. I primi 1.000 giorni di vita sono importanti per la salute e la malattia del bambino prima e dell'adulto poi. I metaboliti che provengono direttamente dalla dieta materna vengono ulteriormente elaborati dal microbiota materno, sono quindi trasferiti al neonato *in utero* attraverso la placenta e dopo il parto attraverso il latte materno e ne influenzano il sistema immunitario. Il microbiota placentare può innescare risposte immunitarie nel feto e programmare lo sviluppo immunitario del bambino durante la vita fetale e poi neonatale.

La trasmissione delle malattie metaboliche ed allergiche dalla madre al bambino è multifattoriale e comprende influenze genetiche, epigenetiche e ambientali. L'obesità materna e la *Western diet* influenzano la produzione di metaboliti che alterano la barriera intestinale e le cellule immunitarie. Una disbiosi in questo periodo può avere effetti funzionali di lunga durata, aumentando il rischio di malattia (allergia, obesità) nell'infanzia e nell'età adulta. L'uso di probiotici adatti e di buona qualità è in grado di prevenire questa disbiosi [3, 4].

I probiotici possono anche avere un effetto preventivo sulle infezioni del tratto respiratorio. Diversi studi hanno dimostrato che ci può essere un effetto protettivo se la supplementazione dei probiotici viene associata ad un'elevata aderenza alla dieta mediterranea durante la gravidanza. Questo migliora anche i sintomi asmatici e la malattia atopica nell'infanzia. Comunque, la disbiosi precoce a livello intestinale (epoca neonatale e prima infanzia) con una minore diversità microbica o una colonizzazione precoce con specie opportunistiche è stata associata a un aumento del rischio di asma. Mentre la specie di *L. rhamnosus* ha dimostrato un ruolo nella durata delle infezioni delle alte vie respiratorie, altri batteri, come Bifidobatteri, *L. casei* (o *L. paracasei subsp. paracasei*), *L. reuteri* e *L. acidophilus*, hanno dimostrato un'efficacia moderata [5].

Tuttavia in nessun caso può avere senso somministrare probiotici adatti e di buona qualità in modo isolato, ma la somministrazione deve essere sempre associata ad altri fattori preventivi, dalla dieta allo stile di vita.

REFERENCES

- [1] Serra-Majem L, Tomaino L, Dernini S, Berry EM, Lairon D, Ngo de la Cruz J, Bach-Faig A, Donini LM, Medina FX, Belahsen R, Piscopo S, Capone R, Aranceta-Bartrina J, La Vecchia C, Trichopoulos A. Updating the Mediterranean Diet Pyramid towards Sustainability: Focus on Environmental Concerns. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(23):8758.
- [2] Baldassarre ME, Palladino V, Amoroso A, Pindinelli S, Mastromarino P, Fanelli M, Di Mauro A, Laforgia N. Rationale of Probiotic Supplementation during Pregnancy and Neonatal Period. *Nutrients*. 2018;10(11):1693.
- [3] Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Wydau-Demattis S. The developing gut microbiota and its consequences for health. *J Dev Orig Health Dis*. 2018;9(6):590-7.
- [4] Mulligan CM, Friedman JE. Maternal modifiers of the infant gut microbiota: metabolic consequences. *J Endocrinol*. 2017;235(1):R1-12.
- [5] Laursen RP, Hojsak I. Probiotics for respiratory tract infections in children attending day care centers – a systematic review. *Eur J Pediatr*. 2018;177(7):979-94.

LECT 8

MICROBIOTA AND NUTRITION IN PEDIATRIC AGE

[MICROBIOTA E NUTRIZIONE IN ETÀ PEDIATRICA]

L. Emma

A.O.U. City of Health and Science of Turin, Turin, Italy

ENGLISH TEXT

During pregnancy, the development of the fetal immune system is supported by microbial

metabolites from the maternal microbiota and from food compounds [1]. Before birth, fetal swallowing exposes its intestine to amniotic fluid, which contains both nutritional substances and developing microbiome. There, nutritional substances, microbiota and their metabolites enter in contact with developing gut sensor cells, the entero-endocrine cells, forming synapses with vagal nodose neurons. The taste of the amniotic fluid depends on the mother's diet, hence the discovery which unveils that food preferences start in the uterus [2].

Subsequently, the birth modality, diet and antibiotic therapy are additional factors which form the microbiota of early childhood and the neonatal immune system. During the subsequent reaction to weaning, a change occurs in its composition. As a result, the microbiota is no longer represented by *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*; however, the metabolomics diversity increases, evolving into a more adult microbiota, which stabilizes during this early period of life. This period is often called "the window of opportunity" since, during this period above all, external signals exert a great impact on lifelong health, on evolving microbiota and on the immune system of the mucosa [1].

In these last few years, obesity and an increase in inflammatory intestinal diseases in early childhood have become a problem in most countries, with significant consequences on long-term health. Several studies have associated excessive birth weight and an alteration in intestinal anatomic architecture with an increase in the local inflammatory state as well as with a specific profile of intestinal microbiota. Factors correlated with dysbiosis which is linked to these medical states include an increase in gestational weight, perinatal diet, administration of antibiotic therapy to mother and/or newborn, the delivery, and the diet followed in early childhood, which is strictly a Western diet [3, 4].

Another factor which contributes to childhood dysbiosis is the excess of hygiene, which is caused by these last two years of the COVID-19 pandemic [5]. An adequate diet, such as the Mediterranean diet which is rich in prebiotic fibres, consistent physical activity and restoration of the intestinal eubiosis using probiotics, guarantees a general readjustment and an improvement in health status [6-11].

ITALIAN TEXT

Durante la gravidanza, lo sviluppo immunitario fetale è supportato dai metaboliti microbici provenienti dal microbiota materno e dai composti

alimentari [1]. Prima della nascita, la deglutizione fetale espone il suo intestino al liquido amniotico, contenente sia sostanze nutritive sia un microbioma in via di sviluppo. Lì, i nutrienti, il microbiota e i loro metaboliti entrano in contatto con le cellule sensoriali intestinali in via di sviluppo, le cellule enteroendocrine, che formano sinapsi con i neuroni nodosi vagali. Il gusto del liquido amniotico dipende dalla dieta della madre, da qui la scoperta che le preferenze alimentari iniziano *in utero* [2].

A seguire, la modalità di nascita, l'alimentazione e l'assunzione di antibiotici sono fattori aggiuntivi che modellano il microbiota della prima infanzia e il sistema immunitario neonatale. Durante la successiva reazione allo svezzamento, si verifica un cambiamento nella composizione del microbiota. Di conseguenza, il microbiota non è più rappresentato da *Bifidobacteria* e *Lactobacilli*, ma con l'aumento della diversità metabolica si evolve in un microbiota più adulto, che si stabilisce durante questo primo periodo di vita. Questo periodo è spesso chiamato anche "finestra di opportunità" poiché i segnali esterni sul microbiota in evoluzione e sul sistema immunitario della mucosa hanno un profondo impatto sulla salute per tutta la vita [1].

In questi ultimi anni l'obesità e l'incremento delle malattie infiammatorie intestinali in età infantile sono diventati un problema nella maggior parte dei Paesi, con conseguenze rilevanti per la salute a lungo termine. Diversi studi hanno associato un peso corporeo eccessivo e un'alterazione dell'architettura anatomiche intestinale, con incremento dello stato infiammatorio locale, ad un profilo specifico del microbiota intestinale. I fattori correlati alla disbiosi legata a queste situazioni patologiche sono: l'aumento di peso gestazionale, la dieta perinatale, la somministrazione di antibiotici alla madre e/o al bambino, il parto e la dieta attuata in età infantile, che è prettamente occidentale [3, 4]. Un ulteriore contributo alla disbiosi infantile è l'eccesso di igiene, causato da questi ultimi due anni di pandemia [5].

Un'alimentazione adeguata, come la dieta mediterranea ricca in fibre prebiotiche, l'attività fisica costante, e il ripristino dell'eubiosi intestinale grazie anche all'uso dei probiotici, garantiscono un riequilibrio generale e un miglioramento dello stato di salute [6-11].

REFERENCES

- [1] Kalbermatter C, Fernandez Trigo N, Christensen S, Ganai-Vonarburg SC. Maternal Microbiota, Early Life Colonization and Breast Milk Drive Immune Development in the Newborn. *Front Immunol.* 2021;12:683022.

- [2] Buchanan KL, Bohórquez DV. You Are What You (First) Eat. *Front Hum Neurosci.* 2018;12:323.
- [3] de Cuevillas B, Milagro FI, Tur JA, Gil-Campos M, de Miguel-Etayo P, Martínez JA, Navas-Carretero S. Fecal microbiota relationships with childhood obesity: A scoping comprehensive review. *Obes Rev.* 2022;23(Suppl 1):e13394.
- [4] Hart L, Verburgt CM, Wine E, Zachos M, Poppen A, Chavannes M, Van Limbergen J, Pai N. Nutritional Therapies and Their Influence on the Intestinal Microbiome in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients.* 2021;14(1):4.
- [5] Shahrabaf MA, Hassan M, Vosough M. COVID-19 and hygiene hypothesis: increment of the inflammatory bowel diseases in next generation? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022;16(1):1-3.
- [6] Davis EC, Dinsmoor AM, Wang M, Donovan SM. Microbiome Composition in Pediatric Populations from Birth to Adolescence: Impact of Diet and Prebiotic and Probiotic Interventions. *Dig Dis Sci.* 2020;65(3):706-22.
- [7] Depoorter L, Vandenplas Y. Probiotics in Pediatrics. A Review and Practical Guide. *Nutrients.* 2021;13(7):2176.
- [8] Rezende ESV, Lima GC, Naves MMV. Dietary fibers as beneficial microbiota modulators: A proposed classification by prebiotic categories. *Nutrition.* 2021;89:111217.
- [9] Minami J, Iwabuchi N, Tanaka M, Yamauchi K, Xiao JZ, Abe F, Sakane N. Effects of *Bifidobacterium breve* B-3 on body fat reductions in pre-obese adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Biosci Microbiota Food Health.* 2018;37(3):67-75.
- [10] Lorenzo O, Crespo-Yanguas M, Hang T, Lumpuy-Castillo J, Hernández AM, Llaveró C, García-Alonso M, Ruiz-Tovar J. Addition of Probiotics to Anti-Obesity Therapy by Percutaneous Electrical Stimulation of Dermatome T6. A Pilot Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(19):7239.
- [11] Włodarczyk M, Śliżewska K, Barczyńska R, Kapuśniak J. Effects of Resistant Dextrin from Potato Starch on the Growth Dynamics of Selected Co-Cultured Strains of Gastrointestinal Bacteria and the Activity of Fecal Enzymes. *Nutrients.* 2022;14(10):2158.

LECT 9

THE MUCO-MICROBIOTIC LAYER: THE INNERMOST COMPONENT OF THE BOWEL WALL

[LO STRATO MUCO-MICROBIOTICO: LA COMPONENTE PIÙ INTERNA DELLA PARETE INTESTINALE]

F. Cappello

Department of Biomedicine, Neuroscience and Advanced Diagnostics, University of Palermo, Palermo, Italy

ENGLISH TEXT

For many years, the bowel mucosa has been considered as the innermost layer of the intestinal wall, being the other layers indicated as submucosa, muscularis propria and adventitia/serosa. However, the discovery that the microbiota – and its alterations – plays an active role in physiology and

pathophysiology of intestinal tract (as well as in the homeostasis of extra-intestinal tissues) raised a methodological and terminological question.

In few words, for decades – perhaps centuries – we have omitted to describe, in living subjects, the real innermost layer of the intestinal wall, i.e. not the mucosa (made up of epithelium, lamina propria and muscularis mucosae) but that layer including the microbiota and its mucous matrix, the latter being that mucus (produced by the epithelial cells) which houses not only the microbiota but also all the nanovesicles through which human cells and microbial cells exchange important information of homeostatic nature. This layer is commonly missed in the routinely histological procedures that include alcoholic solutions by which the mucous is dissolved and the microbiota is destroyed. This is why this layer has not been considered for such a long time.

We hence recently coined the term “muco-microbiotic (MuMi) layer” [1, 2] to indicate the innermost component of the intestinal wall which existence has to be taken in account also for scientific protocols aiming at investigating intestinal diseases and their extraintestinal manifestation. In our opinion, the main components of MuMi layer are three: the mucus (a sort of interstitial matrix), the microbiota (the corpuscular elements) and the nanovesicles (mainly but not exclusively exosomes, produced by human cells, and membrane vesicles, produced by bacteria). The nanovesicle component is particularly important because the bowel is one of the organs in the human body that produces most nanovesicles, and because these are tools of trafficking between bowel and other, distant, anatomical districts including liver, lung, kidney and central nervous system [3-5].

Further studies are necessities to better characterize, from a molecular point of view, the three main components of the MuMi layer, also in regard of its modification related with age, ethnicity, lifestyles, and other genetic and epigenetic variables of the subjects.

ITALIAN TEXT

Per molti anni la mucosa intestinale è stata considerata lo strato più interno della parete di quest'organo, essendo gli altri strati denominati sottomucosa, muscolare propria e sierosa (o avventizia). Tuttavia, la scoperta che il microbiota – e le sue alterazioni – giocano un ruolo attivo nella fisiologia e nella fisiopatologia del tratto intestinale (così come nell'omeostasi di altri tessuti extraintestinali) ha fatto emergere questioni metodologiche e terminologiche.

In poche parole, per decenni – forse secoli – abbiamo ommesso di descrivere, nei soggetti viventi, quello che è realmente lo strato più interno della parete intestinale, ossia non la mucosa (costituita da epitelio, lamina propria e muscolaris mucosae) ma quello strato che include il microbiota e la sua matrice mucosa, quest'ultima costituita da quel muco prodotto dalle cellule epiteliali che ospita non solo il microbiota ma anche tutte quelle nanovesicole attraverso cui le cellule umane e quelle batteriche si scambiano importanti informazioni di natura omeostatica. Questo strato si perde comunemente con le colorazioni istologiche routinarie, che includono soluzioni alcoliche che dissolvono il muco e distruggono il microbiota. Questo è il motivo per cui questo strato non è stato tenuto in considerazione per così tanto tempo. Recentemente abbiamo coniato il termine “strato muco-microbiotico (MuMi)” [1, 2] per indicare questa che è la componente più interna della parete dell'intestino e la cui esistenza dev'essere tenuta in considerazione anche nella messa a punto dei protocolli scientifici finalizzati a studiare le malattie intestinali e le loro manifestazioni extraintestinali. I principali costituenti dello strato MuMi, a nostro modesto avviso, sono tre: il muco (una sorta di matrice interstiziale), il microbiota (gli elementi corpuscolati) e le nanovesicole (principalmente, ma non esclusivamente, gli esosomi, prodotti dalle cellule umane, e le vescicole esterne, prodotte dai batteri). La componente nanovesicolare è particolarmente importante se si considera che l'intestino è uno dei principali produttori di nanovesicole del nostro corpo e che queste sono strumento di scambio di informazioni tra l'intestino e altri distretti anatomici, tra cui il fegato, il polmone, il rene e il sistema nervoso centrale [3-5].

Ulteriori studi sono necessari per caratterizzare meglio, da un punto di vista molecolare, le tre principali componenti dello strato MuMi, anche in relazione all'età, all'etnia, agli stili di vita e ad altre variabili genetiche ed epigenetiche dei soggetti.

REFERENCES

- [1] Cappello F, Mazzola M, Jurjus A, Zeenny MN, Jurjus R, Carini F, Leone A, Bonaventura G, Tomasello G, Bucchieri F, Conway de Macario E, Macario AJL. Hsp60 as a Novel Target in IBD Management: A Prospect. *Front Pharmacol*. 2019;10:26.
- [2] Cappello F, Rappa F, Canepa F, Carini F, Mazzola M, Tomasello G, Bonaventura G, Giuliana G, Leone A, Saguto D, Scalia F, Bucchieri F, Fucarino A, Campisi G. Probiotics Can Cure Oral Aphthous-Like Ulcers in Inflammatory Bowel Disease Patients: A Review of the Literature and a Working Hypothesis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20):5026.

[3] Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulff P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötval J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.

[4] Fais S, O'Driscoll L, Borràs FE, Buzas E, Camussi G, Cappello F, Carvalho J, Cordeiro da Silva A, Del Portillo H, El Andaloussi S, Ficko Trček T, Furlan R, Hendrix A, Gursel I, Kralj-Iglic V, Kaeffer B, Kosanovic M, Lekka ME, Lipps G, Logozzi M, Marcilla A, Sammar M, Llorente A, Nazarenko I, Oliveira C, Pocsfalvi G, Rajendran L, Raposo G, Rohde E, Siljander P, van Niel G, Vasconcelos MH, Yáñez-Mó M, Yliperttula ML, Zarovni N, Zavec AB, Giebel B. Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano*. 2016;10(4):3886-99.

[5] Cappello F, Fais S. Extracellular vesicles in cancer pros and cons: The importance of the evidence-based medicine. *Semin Cancer Biol*. 2022 Feb 4. [Epub ahead of print].

LECT 10

PROBIOTICS ARE NOT ALL THE SAME [I PROBIOTICI NON SONO TUTTI UGUALI]

R. Francavilla, F. Cristofori

Pediatric Gastroenterology, Aldo Moro University, Bari, Italy

ENGLISH TEXT

The field of probiotics is expanding rapidly: consider that from expenditure of \$7 trillion in 2019, it is estimated to reach \$12 trillion in 2025. For this reason, physicians shall use high-quality probiotics; in fact, we have to consider that on the market, we find, depending on the countries where we live, more than 300 different products.

Toscano and coworkers recently published a decalogue that can help consumers in the correct choice [1]. The specific probiotic strain should be indicated and deposited in an international collection, the safety and efficacy for which it is prescribed must be characterized in clinical trials.

It is essential to know: 1) the correct definition of probiotics; 2) what a probiotic is not; 3) the complete identikit of the strain; 4) patient safety comes first; 5) to avoid the development of antibiotic resistance. Probiotics are “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health

benefit on the host” [2]. This definition already clarifies that the product must be alive and in adequate quantities, so we need to make sure that the quantities on the package are met within the product. However, this is not always the case. To exert their action, probiotics must survive gastric acidity and bile and thus be able to colonize the intestine. Colonization studies have shown that this does not happen for all probiotics; therefore, only a few strains give 100% colonization; among them, we find *L. GG (LGG)* and *L. reuteri 17938 (LR-17938)*.

Another fact that distinguishes probiotics comes from the mode of production; in fact, in order to intervene the processes of fermentation, matrix composition, cell culture, lyophilization, and storage conditions. These characteristics are fundamental in determining the survival, growth, and availability of the probiotic and thus its ability to confer a beneficial effect on the host. Furthermore, it is precisely during these procedures that contamination of the substrate can occur, which can be harmful to the patient [3]. Essential are the regulatory arguments since probiotics are registered as a dietary supplement. Unlike drugs, which are strictly regulated in compliance with safety controls before and after sales, products registered as dietary supplements must meet less stringent regulatory criteria. Therefore, we are not surprised to read that, in 42% of cases, the amount of the probiotic is less than what is stated on the package, and in 25% of cases, there is an error in the strain name, and in 17% of cases, there may be no more live products.

The safety of our patients must be our first goal. Therefore, the organisms we use must be safe and therefore not responsible for possible bacteremia, and all those plasmids that may confer antibiotic resistance transmission must have been eliminated. Remember that the European Food Safety Authority clearly states that microbial strains for commercial use used as food supplements should not have any transmissible antibiotic resistance [4].

One rule that allows us to identify valuable products for our patients is to go and evaluate the quality of scientific evidence published in the guidelines of major international scientific societies. For example, in acute gastroenteritis, the guidelines of the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition state that only *LGG*, *S. Boulardii*, *LR-17938* and heat-killed *L. acidophilus* are effective in this condition [5]. Similarly, in infantile colic, the most studied strain is *LR-17938*; in ulcerative colitis the *E. coli Nissle 1917*; in *Helicobacter* infection, *LGG*, *S. Boulardii* and *LR-17938*.

Let us remember the strain specificity that identifies the individual bacterium. For example, if we talk about a *L. rhamnosus*, we should know that there are more than 80 strains; however, only one is *LGG*. This strain differs from all other *L. rhamnosus spp.* precisely because of the presence of a gene that encodes for a membrane pilus that allows it to adhere to enterocytes. Finally, we must remember that the effect demonstrated in clinical trials is strain-dependent. The FAO and WHO state that there is good evidence that strains of specific probiotics are safe for humans and capable of conferring healthful effects on the host; however, such benefits are not transferable to other strains without experimentation.

ITALIAN TEXT

Il campo dei probiotici è in rapida espansione: si pensi che, da una spesa nel 2019 pari a 7 bilioni di dollari, si stima che nel 2025 si arriverà a 12 bilioni di dollari. Questo è il motivo principale che deve spingerci ad utilizzare probiotici di alta qualità; infatti dobbiamo considerare che sul mercato troviamo, in base ai Paesi dove viviamo, più di 300 diversi prodotti.

Toscana e collaboratori hanno recentemente pubblicato un decalogo che può aiutare il medico nella scelta del prodotto da utilizzare [1]. In primo luogo, è bene che sia chiaramente indicato il ceppo specifico del probiotico contenuto nel prodotto e che tale ceppo sia stato depositato in una collezione internazionale; inoltre, devono essere chiaramente caratterizzate la sicurezza e la reale efficacia sulla patologia per la quale viene prescritto.

È importante: a) conoscere la corretta definizione di probiotici; b) conoscere cosa non è un probiotico; c) avere un identikit completo del ceppo; d) ricordare che prima di tutto dobbiamo pensare alla sicurezza del paziente; e) evitare lo sviluppo di resistenza agli antibiotici; f) conoscere le evidenze cliniche a supporto.

Per definizione, i probiotici sono microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un effetto salutare all'ospite [2]. Già questa definizione mette in evidenza che il prodotto deve essere vivo e in quantità adeguata, pertanto dobbiamo assicurarci che le quantità riportate sulla confezione siano realmente rispettate all'interno del prodotto. Tuttavia questo non sempre accade. I probiotici, per esplicare la loro azione, devono essere capaci di sopravvivere all'acidità gastrica e alla bile e quindi essere capaci di colonizzare l'intestino. Gli studi di colonizzazione hanno dimostrato che questo non accade per tutti i probiotici, pertanto solo alcuni

ceppi danno una colonizzazione del 100%; tra essi troviamo il *L. GG (LGG)* e il *L. reuteri 17938 (LR-17938)*.

Un altro dato che contraddistingue i probiotici deriva dalle modalità di produzione, infatti nell'ordine intervengono: i processi di fermentazione, di composizione della matrice, di coltura cellulare, di liofilizzazione e le condizioni di conservazione. Queste caratteristiche sono fondamentali per determinare la sopravvivenza, la crescita, la disponibilità del probiotico e quindi la sua capacità di conferire un effetto benefico per l'ospite. Inoltre, proprio durante queste procedure, può occorrere la contaminazione del substrato, che può risultare nocivo per il paziente [3].

Molto importanti sono gli argomenti regolatori dato che i probiotici sono registrati come supplemento alimentare e a differenza dei farmaci, che sono rigorosamente regolati con controlli di sicurezza prima e dopo la vendita, i prodotti registrati come supplementi alimentari devono rispondere a criteri regolatori meno stringenti. Pertanto non ci stupisce se alcuni lavori hanno dimostrato, ad esempio, che nel 42% dei casi la quantità del probiotico è inferiore a quella riportata sulla confezione, che nel 25% dei casi c'è un errore nella denominazione del ceppo e nel 17% dei casi potrebbero non esserci più prodotti vivi.

La sicurezza del nostro paziente deve essere il nostro primo obiettivo, pertanto gli organismi che utilizziamo devono essere sicuri e quindi non responsabili di possibile batteriemia e devono essere stati eliminati tutti quei plasmidi che possono conferire una trasmissione dell'antibiotico-resistenza. A tale proposito si ricorda che l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare chiaramente stabilisce che i ceppi microbici ad uso commerciale usati come supplementi alimentari non dovrebbero avere nessun'antibiotico-resistenza trasmissibile [4].

Una regola che ci permette di identificare prodotti utili per il nostro paziente è quella di andare a valutare le evidenze scientifiche accolte nelle linee guida delle maggiori società scientifiche internazionali. Ad esempio, nella gastroenterite acuta le linee guida internazionali della Società Europea di Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica stabiliscono che solo il *LGG*, il *S. Boulardii*, il *LR-17938* e il *L. acidophilus* ucciso con calore, sono efficaci in questa condizione [5]. In casi di coliche del lattante il ceppo più studiato è il *LR-17938*, nella rettocolite ulcerosa l'*E. coli Nissle 1917*, nell'infezione da *Helicobacter* il *LGG*, il *S. Boulardii* e il *LR-17938*.

Per concludere, ricordiamoci della ceppo-specificità che identifica il singolo batterio. Ad esempio, se noi parliamo di un *L. rhamnosus*, dobbiamo sapere che ci sono più di 80 ceppi, però solo uno è il *LGG*. Questo ceppo si differenzia da tutti gli altri *L. rhamnosus spp.* proprio per la presenza di un gene che codifica per un pilo di membrana che permette di aderire agli enterociti. Bisogna infine ricordare che l'effetto dimostrato nei trial clinici è ceppo-dipendente; infatti, come ricordato dalla FAO e dalla WHO, esiste una buona evidenza che ceppi di specifici probiotici sono sicuri per l'uomo e capaci di conferire effetti salutari all'ospite, tuttavia tali benefici non sono trasferibili ad altri ceppi senza sperimentazione clinica.

REFERENCES

- [1] Toscano M, De Grandi R, Pastorelli L, Vecchi M, Drago L. A consumer's guide for probiotics: 10 golden rules for a correct use. *Dig Liver Dis.* 2017;49(11):1177-84.
- [2] Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(8):506-14.
- [3] Fenster K, Freeburg B, Hollard C, Wong C, Rønhave Laursen R, Ouwehand AC. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms.* 2019;7(3):83.
- [4] Colautti A, Arnoldi M, Comi G, Iacumin L. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. *Food Microbiol.* 2022;103:103934.
- [5] Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, Lo Vecchio A, Shamir R, Szajewska H; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition; European Society for Pediatric Infectious Diseases. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: update 2014. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;59(1):132-52.

LECT 11

IS THERE A MICROBIOME SIGNATURE IN PEDIATRIC INFLAMMATORY BOWEL DISEASE? [VI È UN MICROBIOMA INTESTINALE SPECIFICO NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI PEDIATRICHE?]

M. Martinelli, A. Staiano

Department of Translational Medical Science, Section of Pediatrics, University of Naples "Federico II", Naples, Italy

ENGLISH TEXT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of life-long chronic and relapsing disorders of the

gastrointestinal tract. Although the incidence and prevalence of IBD differ among countries, the general trend clearly highlights an overall increase over the past few decades in Western countries, especially in adolescence and young adulthood [1]. IBD pathogenesis has not been completely elucidated, although the most recent evidence encompasses a complex interaction between host genetic, environmental and microbial influences, resulting in a dysregulated mucosal immune response against the commensal intestinal microbiota [1]. The involvement of intestinal microbiota has long been hypothesized due to several historical evidences [1]. IBD develops in the intestinal segments with the highest bacteria concentrations [2]. Animals kept under specific germ-free conditions do not develop inflammation until bacteria are introduced [3]. Antibiotic treatment is a viable treatment option for some IBD patients [4]. Nutritional therapy is efficacious in the management of pediatric Crohn's disease (CD) [2]. The development of next-generation sequencing technologies has allowed to partially elucidating the relationship between microbiome and IBD development. Several large cohort studies investigated gut microbiota alterations in patients with IBD by profiling their luminal and mucosal microbial communities. In 2014, Gevers et al. reported the data from a large multicentre North-American cohort of pediatric new-onset CD, confirming that microbiome alterations may be found already at diagnosis in treatment-naïve CD children [3]. In details, the authors found increased abundance in bacteria such as *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae*, and *Fusobacteriaceae*, and decreased abundance in *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales*, and *Clostridiales*. Interestingly, ileal and rectal biopsies showed a higher reliability when compared with fecal samples [3]. Overall, the associated changes in IBD microbiota community composition replicated across different cohort studies include reduced diversity, decreases in the relative abundance of certain groups, such as *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, and expansion of facultative anaerobes, such as *Proteobacteria* and *Actinobacteria*, due to the increased nitrosative and oxidative gut stress [4]. Additionally, a reduction in specific species, such as *F. prausnitzii*, has been reported [4]. However, despite the widespread recognition of dysbiosis in patients with IBD, a detailed microbial IBD signature, as well as a clear differentiation among subtypes, has not yet been identified [4]. This is mainly due to the overall

complexity of the topic and to factors related to the study design. Among the factors negatively affecting the published studies, the use of relatively small cohorts has to be mentioned. In addition, the majority of the studies have been conducted with a cross-sectional design, relying on samples acquired from a single time point. Finally, most of the studies have been performed on fecal rather than intestinal samples [2]. More recently, multiomics approaches allowed to better unraveling the complexity of microbiome modifications in IBD [5]. Lloyd-Price et al. followed 132 IBD patients for 1 year to generate integrated longitudinal molecular profiles of host and microbial activity during disease [5]. Periods of disease activity were characterized by increases in temporal variability, with characteristic taxonomic, functional, and biochemical shifts. Integrative analysis identified microbial, biochemical, and host factors central to this dysregulation [5].

In conclusion, there is growing body of evidence supporting a crucial role of dysbiosis for the pathogenesis of IBD. Nevertheless, this research area has been hindered by technical, clinical, and conceptual challenges. Multiomics longitudinal studies are the only possible key to increase our knowledge and provide insights for preventive strategies development.

ITALIAN TEXT

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) sono un gruppo di malattie cronicorecridivanti del tratto gastrointestinale. Sebbene l'incidenza e la prevalenza delle MICI differiscano tra i Paesi, la tendenza generale evidenzia un aumento complessivo, soprattutto nell'adolescenza [1]. La patogenesi delle MICI non è stata completamente chiarita, sebbene le evidenze più recenti indichino una complessa interazione tra influenze genetiche, ambientali e microbiche, con conseguente risposta immunitaria mucosale disregolata contro il microbiota intestinale [1]. Il coinvolgimento del microbiota è stato a lungo ipotizzato a causa di diverse evidenze [1]. Le MICI si sviluppano nei segmenti intestinali con la più alta concentrazione di batteri [2]. I modelli animali tenuti in condizioni specifiche di assenza di germi non sviluppano infiammazione fino all'introduzione dei batteri [3]. Il trattamento antibiotico è una valida opzione terapeutica per alcuni pazienti con MICI [4]. La terapia nutrizionale è efficace nella gestione della malattia di Crohn (MC) pediatrica [2]. Lo sviluppo di tecnologie di sequenziamento genico di nuova generazione ha permesso in parte di chiarire la relazione tra microbioma e sviluppo

di MICI. Diversi studi di coorte hanno analizzato le alterazioni del microbiota intestinale nei pazienti con MICI. Nel 2014 Gevers e colleghi hanno riportato i dati di un'ampia coorte nordamericana, multicentrica con MC pediatrica, confermando che alterazioni del microbioma possono essere riscontrate alla diagnosi [3]. Nel dettaglio, gli autori hanno riscontrato una maggiore abbondanza di *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae* e *Fusobacteriaceae* e una riduzione di *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales* e *Clostridiales*. È interessante notare come le biopsie ileali e rettali abbiano mostrato una maggiore affidabilità rispetto ai campioni fecali [3]. Complessivamente, le modifiche del microbiota nelle MICI replicate in diversi studi includono una riduzione della diversità, una diminuzione di alcuni gruppi, quali *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, e l'espansione degli anaerobi facoltativi, come *Proteobacteria* e *Actinobacteria* [4]. Inoltre, è stata segnalata una riduzione di specifiche specie, quale il *F. prausnitzii* [4]. Tuttavia, nonostante il riconoscimento della disbiosi nei pazienti con MICI, non è stata ancora identificata una specifica firma microbica, e nemmeno una chiara differenziazione tra i diversi sottotipi di malattia [4]. Ciò è dovuto alla complessità del *topic* e a fattori legati al disegno degli studi. Tra i fattori che hanno negativamente influenzato gli studi pubblicati, va menzionato l'uso di coorti relativamente piccole. Inoltre, la maggior parte degli studi è stata realizzata con un disegno trasversale basato su campioni acquisiti in un unico *timing*. Infine, molti sull'uomo hanno analizzato il microbiota fecale piuttosto che intestinale [2]. Più recentemente, gli approcci multiomici hanno permesso di rilevare maggiormente la complessità del microbioma nei pazienti con MICI [5]. Lloyd-Price e colleghi hanno seguito 132 pazienti con MICI per un anno per generare profili molecolari longitudinali integrati dell'ospite e dell'attività microbica durante le diverse fasi di malattia [5]. I periodi di attività della malattia sono stati caratterizzati da un aumento della variabilità temporale, con cambiamenti tassonomici, funzionali e biochimici caratteristici. L'analisi integrativa ha identificato fattori microbici, biochimici e dell'ospite in questa disregolazione [5].

In conclusione, vi è un crescente numero di evidenze a sostegno di un ruolo cruciale della disbiosi per la patogenesi delle MICI. Tuttavia, quest'area di ricerca è stata ostacolata da problematiche tecniche, cliniche e concettuali. Gli studi longitudinali multiomici sono l'unica chiave per aumentare le

nostre conoscenze e fornire nuove indicazioni per lo sviluppo di strategie preventive.

REFERENCES

- [1] Dheri AK, Kuenzig ME, Mack DR, Murthy SK, Kaplan GG, Donelle J, Smith G, Benchimol EI. Meta-analysis of multi-jurisdictional health administrative data from distributed networks approximated individual-level multivariable regression. *J Clin Epidemiol*. 2022 May 19. [Epub ahead of print].
- [2] Lee M, Chang EB. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome – Searching the Crime Scene for Clues. *Gastroenterology*. 2021;160(2):524-37.
- [3] Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, Morgan XC, Kostic AD, Luo C, González A, McDonald D, Haberman Y, Walters T, Baker S, Rosh J, Stephens M, Heyman M, Markowitz J, Baldassano R, Griffiths A, Sylvester F, Mack D, Kim S, Crandall W, Hyams J, Huttenhower C, Knight R, Xavier RJ. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):382-92.
- [4] Schirmer M, Garner A, Vlamakis H, Xavier RJ. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(8):497-511.
- [5] Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, Schirmer M, Avila-Pacheco J, Poon TW, Andrews E, Ajami NJ, Bonham KS, Brislawn CJ, Casero D, Courtney H, Gonzalez A, Graeber TG, Hall AB, Lake K, Landers CJ, Mallick H, Plichta DR, Prasad M, Rahnavard G, Sauk J, Shungin D, Vázquez-Baeza Y, White RA 3rd; IBDMDB Investigators, Braun J, Denson LA, Jansson JK, Knight R, Kugathasan S, McGovern DPB, Petrosino JF, Stappenbeck TS, Winter HS, Clish CB, Franzosa EA, Vlamakis H, Xavier RJ, Huttenhower C. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature*. 2019;569(7758):655-62.

LECT 12

MICROBIOTA AND NEURODEVELOPMENT [MICROBIOTA E NEUROSVILUPPO]

P. Rossi

Department of Biology and Biotechnology, University of Pavia, Pavia, Italy

ENGLISH TEXT

The life of the newborn, infant and child is an extremely sensitive time window for the effects of the gut microbiome on the brain, determining critical effects on neurodevelopment. Thus, in this critical time window, early perturbations could cause a dysbiotic condition of the gut microbiome determining an adverse ontogenesis of the central nervous system (CNS). In fact, fundamental processes, such as neuronal migration, axonal and dendritic growth, synaptogenesis, programmed cell death processes, myelination and modeling of the developing neural networks and synapses formation, mirror the sequential choreographic progression of commensals bacterial colonization. Those bacteria co-evolve with the host in the first months of life [1].

At the level of more integrated functions, these changes are involved in the so-called “social brain”. The “social brain” includes the development of fundamental sequential phases, which in the first 3 years, determine the development of innate reflexes, attachment to the breast, babbling, pointing, eye contact, joint attention, imitation, speech, gestures, pro-social behaviors, self-awareness and self-regulation, and empathy [2].

Given these premises, the great challenge for researchers is to understand the pioneer microbiota interaction with the developing endocrine, immune and nervous systems.

The use of germ-free mice has made it possible to obtain fundamental information on the microbiota-gut-brain axis during neurodevelopment. The changes in animal behavior in relation to changes induced to the microbiota in this animal model, completely sterile at birth, allowed us to study their effects on four major areas of interest [3]:

1. hormonal signals related to stress;
2. the neuroprotective effects;
3. behavioral profiles in anxiety, in cognitive deficits, in the alteration of social behaviors and in stereotyped and repetitive behaviors;
4. neural cellular mechanisms.

These studies underline that the systems involved in the gut-microbiota-brain axis in mammals have evolved to be “microbe expectant” in the same way that the sensory system waits for sensory inputs in order to develop physiologically.

An ongoing scientific dispute concerns the possibility that bacterial colonization already begins in the fetus during pregnancy. The two hypotheses, “*in utero* colonization hypothesis” and “sterile womb hypothesis”, are currently source of discussion [4].

In the gastric aspiration of newborns 1 hour after vaginal birth (but not after caesarean delivery), there are bacteria in the stomach acquired during the passage through the birth canal. Immediately after giving birth, with breastfeeding, the newborn meets about one million bacteria a day present in breast milk and meconium. In the first days of life, there is a transition from aerobic bacteria, including *Streptococcus*, to anaerobic and facultative aerobic bacteria, including *Lactobacilli* and, subsequently, *Bifidobacteria*.

The diet is the most powerful modulator of the intestinal microbiota and, in particular, the use of carbohydrates accessible to the microbiota (MAC), present as soluble fibers in fruit and vegetables, allow obtaining a good ecological fitness with an optimal production of butyrate in the gut. Several studies

show how the mother’s diet during pregnancy is able to influence the newborn neurodevelopment [5].

ITALIAN TEXT

La vita del neonato, dell’infante e del bambino costituisce un periodo estremamente sensibile per gli effetti del microbioma intestinale sullo sviluppo neuronale. Così, in questa critica finestra temporale, perturbazioni precoci che determinano condizioni di disbiosi del microbioma intestinale possono determinare un’ontogenesi avversa del sistema nervoso centrale (SNC). Infatti, processi fondamentali, quali la migrazione neuronale, la crescita assonale e dendritica, la sinaptogenesi, i processi di morte cellulare programmata, la mielinizzazione e i processi di modellamento delle reti neurali e delle sinapsi, si accompagnano ad una coreografica successione di colonizzazione con batteri commensali che coevolvono con l’ospite nei primi mesi di vita [1].

A livello delle funzioni più integrate, questi cambiamenti si esprimono con la nascita del cosiddetto “*social brain*” nei primi 3 anni di vita. Il *social brain* si esprime con lo sviluppo di fasi fondamentali e sequenziali della vita, quali lo sviluppo dei riflessi innati, l’attaccamento al seno, il *babbling*, il *pointing* e il contatto con gli occhi, il raggiungimento dell’attenzione, l’imitazione, la parola, i gesti, comportamenti pro-sociali, lo sviluppo dell’autoconsapevolezza, dell’autoregolazione e l’empatia [2]. Considerate queste premesse, la grande sfida per i ricercatori è capire come questo “*pioneer microbiota*” interagisce con il sistema endocrino, immunitario e nervoso in via di sviluppo.

L’uso di modelli animali particolari, quali i *germ-free mice*, ha permesso di ottenere informazioni fondamentali sull’asse *microbiota-gut-brain*, in particolare durante il neurosviluppo. Le modifiche del comportamento animale in relazione a modifiche indotte al microbiota in questi animali, completamente sterili alla nascita, hanno permesso di studiare l’interazione *microbiota-gut-brain* in queste aree di interesse [3]:

1. i segnali ormonali legati allo stress;
2. gli effetti neuroprotettivi;
3. i profili comportamentali nell’ansia, nei deficit cognitivi, nell’alterazione dei comportamenti sociali e nei comportamenti stereotipati e ripetitivi;
4. i meccanismi cellulari neurali.

Da questi studi si dimostra che i sistemi coinvolti nell’asse *microbiota-gut-brain* nei mammiferi si sono evoluti per essere *microbe expectant*, in modo analogo allo sviluppo del sistema sensoriale che aspetta gli *input* sensoriali per potersi evolvere in modo fisiologico.

È ancora discusso, in ambito scientifico, se la colonizzazione batterica abbia inizio già nel feto durante la gravidanza o se il feto sia sterile dal punto di vista batterico. Le due ipotesi (*in utero colonization hypothesis* e *sterile womb hypothesis*) sono ancora oggi fonte di discussione [4].

Nell'aspirato gastrico di neonati ad 1 ora dal parto vaginale (ma non dal parto cesareo) sono presenti nello stomaco batteri acquisiti durante il passaggio nel canale del parto. Appena dopo il parto, con l'allattamento, il neonato viene in contatto con circa un milione di batteri al giorno presenti nel latte materno e nel meconio. Nei primi giorni di vita si assiste ad una transizione da batteri aerobi, tra i quali lo *Streptococco*, a batteri anaerobi e aerobi facoltativi, tra i quali *Lactobacilli* e, successivamente, Bifidobatteri.

La dieta è il più potente modulatore del microbiota intestinale e, in particolare, l'utilizzo di carboidrati accessibili al microbiota (MAC), presenti come fibre solubili in frutta e verdura, permette di ottenere una buona *fitness* ecologica con una produzione ottimale di butirrato nell'intestino. Diversi studi dimostrano come l'alimentazione della mamma durante la gravidanza sia in grado di influenzare il neurosviluppo del neonato [5].

REFERENCES

- [1] Del Chierico F, Vernocchi P, Petrucca A, Paci P, Fuentes S, Praticò G, Capuani G, Masotti A, Reddel S, Russo A, Vallone C, Salvatori G, Buffone E, Signore F, Rigon G, Dotta A, Miccheli A, de Vos WM, Dallapiccola B, Putignani L. Phylogenetic and Metabolic Tracking of Gut Microbiota during Perinatal Development. *PLoS One*. 2015;10(9):1-26.
- [2] Karaivazoglou K, Konstantakis C, Assimakopoulos SF, Triantos C. Neonate gut colonization: The rise of a social brain. *Neurogastroenterol Motil*. 2020;32(5):1-7.
- [3] Luczynski P, McVey Neufeld KA, Oriach CS, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016;19(8):1-17.
- [4] Walter J, Hornef MW. A philosophical perspective on the prenatal in utero microbiome debate. *Microbiome*. 2021;9(1):5.
- [5] Coley EJJ, Hsiao EY. Malnutrition and the microbiome as modifiers of early neurodevelopment. *Trends Neurosci*. 2021;44(9):753-64.

LECT 13

MICROBIOMICS AND METABOLOMICS IN AUTISM SPECTRUM DISORDER [MICROBIOMICA, METABOLOMICA E DISTURBI DELLO SPETTRO AUTISTICO]

M. Mussap

Department of Surgical Sciences, University of Cagliari, Cagliari, Italy

ENGLISH TEXT

Autism is a neurodevelopmental disorder representing a severe concern for patients, their families, neuropsychiatrists, and caregivers. Unfortunately, a single assessment or a single treatment for autism does not exist, due to the extraordinary variety of clinical signs and symptoms between patients [1]. Thus, it was coined the term “autism spectrum disorder” (ASD) to underline the galaxy of clinical and molecular phenotypes depicting autism.

About one in 160 children is autistic, corresponding to at least 78 million affected people worldwide. The incidence of ASD is higher in males as compared to females, with a mean males:females (M:F) ratio 4:1. However, the co-existence or absence of intellectual disability strongly impacts on this ratio [2].

More than 881 genes have been implicated in autism, at least one from every chromosome. However, the etiology of ASD is only partially genetic; environmental risk factors play a predominant role in ASD origin.

Gut microbiota plays a major role in ASD; in fact, the gut bacterial homeostasis impacts on brain development, behavioral functions, and blood-brain-barrier integrity. Overall, in autistic subjects, gut dysbiosis is common; the notion that *Bacteroidetes* are significantly reduced, leading to a higher *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, is well established [3]. Unfortunately, results emerging from studies on gut dysbiosis in ASD are controversial. For example, some studies found the overgrowth of *Akkermansia spp.* in autism, whereas others reported the depletion of this genus. Various factors affect differences between studies including disease severity and phenotype, type of biological sample (stool, endoscopic biopsies), site of the biopsy sampling, diet and medications, techniques utilized for metagenomics. Most studies found that *F. prausnitzii*, *Coprococcus spp.*, and *Bifidobacteria* are significantly reduced in autism. An early study found that *Veillonaceae*, *Prevotellaceae*, and *Lachnospiraceae* were significantly reduced in autistic children compared with neurotypical children; conversely, *Lactobacillaceae* were increased.

The metabolic fingerprint of ASD may be roughly depicted by alterations in mammalian-microbial co-metabolites; mitochondrial dysfunction; oxidative stress; amino acid metabolism. Among the mammalian-microbial co-metabolites, short-chain fatty acids (SCFAs) play a primary role [4]. Total SCFAs are significantly reduced in autism; conversely, propionate and acetate are higher,

suggesting that the total reduction in SCFAs is due to the dramatic reduction in butyrate. Butyrate is an energy source for colonocytes and prevents inflammation by regulating the oxidative state of the mucosal cells. The excess of propionic acid associated with leaky gut leads to the accumulation of this metabolite within the central nervous system, where it inhibits the gap junction closure. The latter is vital for the synchronization of neural electrical activity. A further microbial co-metabolite is p-cresol, an organic aromatic compound mainly derived from the tyrosine catabolism. *C. difficile* and *P. stutzeri* are the main sources of p-cresol in humans; however, at least 55 bacteria strains may produce p-cresol. P-cresol inhibits the dopamine-beta-hydroxylase, leading to an imbalance of neurotransmitters and playing a primary role in the accumulation of dopamine.

In autistic children, the metabolome is influenced by the impairment in methylation with lower baseline plasma concentrations of methionine, homocysteine, cysteine, S-adenosyl methionine, cystathionine, total glutathione and increased oxidative stress.

Scyllo-inositol is significantly reduced in autistic subjects. In the brain of healthy adults with normal neurologic status, scyllo-inositol is approximately 100-fold greater than in the surrounding tissues. The depletion of scyllo-inositol has proconvulsant effects and may be consistent with an altered neurobiological profile. In autistic children with leaky gut, we found a significant increase in fucose, phenylacetyl glycine, nicotinurate, and 1-methyl-nicotinamide. This finding was not present in autistic children with normal gut permeability [5].

In conclusion, metabolomics and microbiomics offer a challenging perspective for the very early diagnosis of ASD even in the early phases of the life.

ITALIAN TEXT

L'autismo è un disordine del neurosviluppo che rappresenta un grave problema medico-assistenziale per i pazienti, la loro famiglia, gli specialisti neuropsichiatri e le strutture sociali e assistenziali coinvolte nelle cure. Purtroppo non esiste un quadro clinico unico ben definito, né tantomeno esiste un unico tipo di trattamento farmacologico e/o assistenziale, a causa dell'estrema eterogeneità dei quadri clinici associati all'autismo [1]. Per questo motivo, è stato coniato il termine "disturbi dello spettro autistico". Nel mondo si stima che circa un bambino ogni 160 sia affetto da autismo, stima corrispondente a circa 78 milioni di individui. La

prevalenza è più elevata nei soggetti maschi, anche se il rapporto maschi/femmine (4:1) è fortemente influenzato dalla presenza o meno di disturbi dell'apprendimento e dello sviluppo intellettuale [2]. Sono stati identificati oltre 881 geni associati all'autismo; ciononostante, l'etiologia dell'autismo non è solo genetica, ma riconosce in molti fattori ambientali la sua causa o concausa.

Tra questi, il microbiota intestinale svolge un ruolo di primo piano; infatti, l'omeostasi dell'ecosistema batterico intestinale influenza significativamente lo sviluppo del sistema nervoso centrale, gli aspetti comportamentali e l'integrità della barriera emato-encefalica. È universalmente dimostrato che nell'autismo coesiste la disbiosi intestinale, con un alterato rapporto *Bacteroides/Firmicutes* a causa della riduzione del phylum *Bacteroides* [3]. Sfortunatamente, i dati relativi alle variazioni del microbiota intestinale nell'autismo sono spesso discordanti tra loro. Per esempio, il genere *Akkermansia* è stato trovato aumentato in alcuni studi su soggetti autistici e diminuito in altri. Ciò è dovuto a vari fattori, tra cui: gravità del quadro clinico e presenza di comorbidità, tipo di campione biologico sul quale si effettua l'analisi (feci, frammento biotico), sito di prelievo biotico, dieta e farmaci assunti, tecniche usate per la metagenomica. Tuttavia, la maggior parte degli studi riporta una significativa riduzione di *F. prausnitzii*, *Coprococcus spp.*, e *Bifidobacteria*. Una delle prime rassegne pubblicate sull'argomento riportava la riduzione di *Veillonellaceae*, *Prevotellaceae*, e *Lachnospiraceae* associata all'aumento di *Lactobacillaceae*.

Il profilo metabolico nell'autismo è caratterizzato da alterazioni di co-metaboliti microbici, disfunzione mitocondriale, stress ossidativo e disturbi del metabolismo degli aminoacidi. Per quanto riguarda i co-metaboliti microbici, gli acidi grassi a catena corta rivestono un ruolo di primo piano [4]. Se da un lato il loro ammontare totale risulta diminuito nell'autismo, l'acido propionico e l'acido acetico sono più elevati, mentre l'acido butirrico è drasticamente diminuito. L'acido butirrico è estremamente importante quale fattore energetico per le cellule del colon e come fattore antinfiammatorio e anti-stress ossidativo. Pertanto la sua drastica riduzione è molto dannosa per l'insorgenza dell'infiammazione e dell'aumento della permeabilità intestinale. Questi due fattori rendono molto dannoso l'eccesso di acido propionico, favorendo il suo passaggio dall'intestino al circolo e da quest'ultimo al sistema nervoso centrale, ove inibisce la chiusura

delle giunzioni comunicanti (*nexus*) intercellulari, essenziali per la corretta trasmissione dell'impulso nervoso. Un altro co-metabolita batterico tossico è il p-cresolo, un composto organico aromatico prodotto principalmente da due specie batteriche, *C. difficile* e *P. stutzeri*, anche se ben 55 altri ceppi batterici possiedono il corredo enzimatico per produrre il p-cresolo. Il p-cresolo inibisce l'enzima dopamina-beta-idrossilasi, causando l'accumulo di dopamina e lo squilibrio tra neurotrasmettitori.

Nell'autismo, il metaboloma è influenzato da alterazioni della metilazione con diminuzione significativa della concentrazione plasmatica di metionina, omocisteina, cisteina, S-adenosil metionina, cistationina, glutazione e aumento dello stress ossidativo.

Il nostro gruppo ha dimostrato una significativa riduzione dello scillo-inositolo nei bambini autistici. Nel cervello di adulti sani, il livello di scillo-inositolo è circa 100 volte superiore a quello degli altri organi e la sua riduzione può provocare effetti convulsivanti compatibili con alterazioni del profilo neuropsichico e neurobiologico.

Infine, il nostro gruppo ha osservato che la coesistenza di alterata permeabilità intestinale in bambini autistici causa l'aumento di 4 metaboliti: fucosio, fenilacetilglicina, nicotinurato, e 1-metilnicotinamide [5].

In conclusione, microbiomica e metabolomica offrono una prospettiva di diagnosi estremamente precoce di autismo, anche nei primi giorni di vita, in assenza di segni e sintomi, attualmente rilevabili solo intorno ai 2-3 anni di età.

REFERENCES

- [1] Lord C, Charman T, Havdahl A, Carbone P, Anagnostou E, Boyd B, Carr T, de Vries PJ, Dissanayake C, Divan G, Freitag CM, Gotelli MM, Kasari C, Knapp M, Mundy P, Plank A, Scahill L, Servili C, Shattuck P, Simonoff E, Singer AT, Slonims V, Wang PP, Ysraelit MC, Jellett R, Pickles A, Cusack J, Howlin P, Szatmari P, Holbrook A, Toolan C, McCauley JB. The Lancet Commission on the future of care and clinical research in autism. *Lancet*. 2022;399(10321):271-334.
- [2] Ferri SL, Abel T, Brodtkin ES. Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: a Review. *Curr Psychiatry Rep*. 2018;20(2):9.
- [3] Xu M, Xu X, Li J, Li F. Association Between Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Psychiatry*. 2019;10:473.
- [4] Peralta-Marzal LN, Prince N, Bajic D, Roussin L, Naudon L, Rabot S, Garssen J, Kraneveld AD, Perez-Pardo P. The Impact of Gut Microbiota-Derived Metabolites in Autism Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18):10052.
- [5] Piras C, Mussap M, Noto A, De Giacomo A, Cristofori F, Spada M, Fanos V, Atzori L, Francavilla R. Alterations of the Intestinal Permeability are Reflected by Changes in the Urine Metabolome of Young Autistic Children: Preliminary Results. *Metabolites*. 2022;12(2):104.

LECT 14

WHAT FUTURE FOR HUMAN HEALTH? [QUALE FUTURO PER LA SALUTE UMANA?]

A. Maglioni

Independent researcher, Civitella di Romagna, Italy

ENGLISH TEXT

“Time is the great enigma of men. It is the perception of the past that changes feelings, emotions, behaviors, which gives joy and pain. Man’s change is a function of time that goes on in the perception of him. Time passes and man changes in the memory of his past. [...] The future, therefore, has no quantifiable earthly dimension and, without dimension, there is no material existence. The projection into the future coincides with illusion – something we do not know but that one builds with no certainty or by approximation” [1].

We must act today for present and tomorrow’s health. To understand the basics of health, we can no longer neglect “the hidden organ”: the microbiota. Recent research shows that 90% of US children do not have *B. longum* [2], with a lack of many other beneficial bacteria and a high presence of genes involved in bacterial resistance; this should make us reflect. Furthermore, we cannot forget that *Bifidobacteria* are key intestinal bacteria for the use of breast milk and for the development of the immune system. They will also write important chapters in this extraordinary book which is life; they will guide immune responses, metabolize foods, fight pathogens, improve barrier function with profound influences on the central nervous system (CNS). In this regard, we have clear evidence on how some bacteria can interact with the CNS; these bacteria are called “psychobiotics”. Psychobiotics enhance the production of neurotransmitters in the gut, including dopamine (DA), serotonin (5-HT), norepinephrine (NA), and g-aminobutyric acid (GABA), which modulate neurotransmission in proximal synapses of the enteric nervous system. This action restores the intestinal barrier function and reduces the circulating concentrations of glucocorticoids and pro-inflammatory cytokines. The increase in concentrations of anti-inflammatory cytokines increases the integrity of the blood-brain barrier, the intestinal barrier and reduces systemic inflammation [3].

It is also shown that the development of the intestinal microbiota occurs during early childhood and infancy influences the pathobiology of diseases later in life [4]. In addition, breastfeeding, natural childbirth and

early use of antibiotics are associated with positive and negative changes in the microbiota. We must therefore change strategies: act immediately if we want to reverse the curve towards a future of health. However, let's not forget that action is a process of the present; it must be implemented as soon as possible during the window of vulnerability, i.e. in the first 1,000 days of life [5]. In this period, we must avoid disturbing factors such as the abuse of antibiotics, favoring natural childbirth and breastfeeding in order to obtain an eubiosis and diversified microbiota. The restoration of the compromised microbiota, through microbiota modulation strategies through the early insertion of probiotic bacterial strains, will allow us to modify its trajectory while avoiding dangerous derailments.

ITALIAN TEXT

“Il tempo è il grande enigma degli uomini. È la percezione del passato che fa cambiare sentimenti, emozioni, comportamenti, che dona gioia e dolore. Il cambiamento dell'uomo è una funzione del tempo che va avanti nella sua percezione. Il tempo passa e l'uomo cambia nella memoria del suo passato. [...] Il futuro, quindi, non ha dimensione terrena quantificabile e, senza dimensione, non c'è esistenza materiale. La proiezione nel futuro coincide con l'illusione – qualcosa che non conosciamo ma che si costruisce senza certezza o per approssimazione” [1].

Dobbiamo agire oggi per la salute presente e del domani.

Per comprendere le basi della salute, non possiamo più trascurare “l'organo nascosto”: il microbiota. Recenti ricerche dimostrano che il 90% dei bambini statunitensi non possiede il *B. longum* [2], con carenze di moltissimi altri batteri benefici e un'elevata presenza di geni coinvolti nella resistenza batterica; questo dovrebbe farci riflettere. Non possiamo inoltre dimenticare che i Bifidobatteri sono batteri intestinali chiave per l'utilizzo del latte materno e per lo sviluppo del sistema immunitario. Essi inoltre scriveranno capitoli importanti in questo libro straordinario che è la vita; orienteranno le risposte immunitarie, metabolizzeranno gli alimenti, combatteranno i patogeni, miglioreranno la funzione di barriera con profonde influenze sul sistema nervoso centrale (SNC). A tal proposito abbiamo prove evidenti su come alcuni batteri possano interagire con il SNC; questi batteri prendono il nome di “psicobiotici”. Gli psicobiotici migliorano la produzione di neurotrasmettitori nell'intestino, tra cui

dopamina (DA), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e acido g-aminobutirrico (GABA), che modulano la neurotrasmissione nelle sinapsi prosimali del sistema nervoso enterico. Tale azione ripristina la funzione di barriera intestinale e riduce le concentrazioni circolanti di glucocorticoidi e citochine proinfiammatorie. L'aumento delle concentrazioni di citochine antinfiammatorie aumenta l'integrità della barriera emato-encefalica, della barriera intestinale e riduce l'infiammazione sistemica [3].

È dimostrato poi che lo sviluppo del microbiota intestinale avviene durante la prima infanzia e che l'infanzia influenza la patobiologia delle malattie più avanti nella vita [4]. Inoltre, l'allattamento al seno, il parto naturale, l'uso precoce di antibiotici sono associati a cambiamenti del microbiota in positivo e negativo. Dobbiamo quindi cambiare strategie: agire immediatamente se vogliamo invertire la curva verso un futuro di salute. Non dimentichiamo però che l'azione è un processo del presente; essa deve essere messa in atto il prima possibile durante la finestra di vulnerabilità, ovvero nei primi 1.000 giorni di vita [5]. In questo periodo dobbiamo evitare fattori perturbanti, come l'abuso di antibiotici, e privilegiare il parto naturale e l'allattamento al seno al fine di ottenere un microbiota in eubiosi e diversificato. Il ripristino del microbiota compromesso, mediante strategie di modulazione del microbiota tramite l'inserimento precoce di ceppi batterici probiotici, ci consentirà di modificarne la traiettoria evitando nel contempo pericolosi deragliamenti.

REFERENCES

- [1] Cocchi M, Capezzani L. Time & Free Will: Concepts & Considerations. *Sci GOD J.* 2017;8(2):164-6.
- [2] Casaburi G, Duar RM, Brown H, Mitchell RD, Kazi S, Chew S, Cagney O, Flannery RL, Sylvester KG, Frese SA, Henrick BM, Freeman SL. Metagenomic insights of the infant microbiome community structure and function across multiple sites in the United States. *Sci Rep.* 2021;11(1):1472.
- [3] Sarkar A, Lehto SM, Harty S, Dinan TG, Cryan JF, Burnet PWJ. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria-Gut-Brain Signals. *Trends Neurosci.* 2016;39(11):763-81.
- [4] Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, Ross MC, Lloyd RE, Doddapaneni H, Metcalf GA, Muzny D, Gibbs RA, Vatanen T, Huttenhower C, Xavier RJ, Rewers M, Hagopian W, Toppari J, Ziegler AG, She JX, Akolkar B, Lernmark A, Hyoty H, Vehik K, Krischer JP, Petrosino JF. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature.* 2018;562(7728):583-8.
- [5] Stiemsma LT, Michels KB. The Role of the Microbiome in the Developmental Origins of Health and Disease. *Pediatrics.* 2018;141(4):e20172437.