

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

## SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Fisioterapia

# **L'ATTIVITÀ FISICA COME VARIABILE DELLO STILE DI VITA IN GRADO DI MODULARE IL MICROBIOTA INTESTINALE: SCOPING REVIEW**

Tesi di Laurea in Oncologia

**Presentata da:**

Lorenzo Quartieri

**Relatore:**

Chiar.mo Prof. Antonio Maestri

**Anno Accademico 2019/2020**

**Sessione I**

**Matricola 812686**



## Sommario

<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>1.0 INTRODUZIONE</b> .....	6
<b>2.0 CAPITOLO 1: IL MICROBIOTA INTESTINALE</b> .....	7
<b>2.1 Definizione</b> .....	7
<b>2.3 Diversità</b> .....	7
<b>2.4 Teoria ologenomica</b> .....	8
<b>2.5 Composizione</b> .....	8
<b>2.6 Fattori che influenzano la composizione microbionica</b> .....	9
<u>Età</u> .....	9
<u>Dieta</u> .....	10
<u>Antibiotici</u> .....	11
<b>2.7 Funzioni</b> .....	12
<u>Metabolica</u> .....	12
<u>Protettiva</u> .....	14
<u>Immunomodulazione</u> .....	15
<u>Strutturale</u> .....	15
<u>Neurologica</u> .....	16
<b>2.8 Prebiotici e Probiotici</b> .....	16
<b>CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI</b> .....	17
<b>2.1 Scopo della ricerca</b> .....	17
<b>2.2 Criteri di eleggibilità degli studi</b> .....	17
<b>2.3 Informazione sulle fonti di ricerca</b> .....	18
<b>2.4 Strategie di ricerca</b> .....	18
<b>CAPITOLO 3: ANALISI CRITICA DELLA LETTERATURA</b> .....	19
<b>3.1 Identificazione e selezione degli studi</b> .....	19
<b>3.2 Strumenti di valutazione della qualità metodologica</b> .....	21

<b>3.3 Descrizione degli studi</b> .....	22
<b>Articolo 1</b> .....	22
<b>Articolo 2</b> .....	26
<b>Articolo 3</b> .....	30
<b>Articolo 4</b> .....	33
<b>3.3 Tabelle sinottiche</b> .....	35
<b>CAPITOLO 4: DISCUSSIONE</b> .....	40
<b>4.1 Limiti</b> .....	43
<b>CAPITOLO 5: CONCLUSIONE</b> .....	44
<b>5.1 Implicazione per la ricerca</b> .....	44
<b>5.2 Implicazioni per la pratica</b> .....	46
<b>BIBLIOGRAFIA:</b> .....	47

## ABSTRACT

### Background

Con il termine microbiota intestinale, si definisce la comunità microbica del tratto enterico, composta da trilioni di microorganismi in grado di svolgere funzioni essenziali per l'ospite: metaboliche, strutturali e di protezione. Il suo ruolo, nei meccanismi di salute e di prevenzione, è al centro dell'interesse medico. Ma le modalità con cui il microbiota può essere alterato a nostro favore, non sono ancora del tutto chiare. Evidenze sulla modulazione da parte della dieta sono sempre più attendibili, mentre il ruolo dell'attività fisica, è ancora da approfondire, con una letteratura basata principalmente sull'effetto dell'esercizio fisico negli animali.

### Scopo della ricerca

Indagare la letteratura a supporto dell'efficacia dell'attività fisica come fattore in grado di alterare la composizione del microbiota intestinale nell'adulto sano.

### Materiali e metodi

La ricerca è stata condotta nel periodo di tempo che va da maggio 2020 a settembre 2020, consultando i database Pubmed, PEDro e Cochrane. Le parole chiave utilizzate sono state *Physical exercise, Aerobic exercise, Physical activity, Cardiorespiratory fitness, Gut microbiota, Microbiome, Adult, Human, Probiotics e Diet*, combinate con l'operatore booleano *AND, OR e NOT*. Sono stati inclusi studi primari e secondari, in lingua italiana o inglese, che valutassero l'alterazione della comunità microbica, in adulti sani, dopo aver svolto esercizio fisico.

### Risultati

La ricerca in letteratura e l'analisi degli studi, attraverso i criteri di eleggibilità, hanno condotto all'individuazione di un RCT, un *clinical trial* e due *case report*.

### Conclusioni

Gli studi analizzati riportano risultati incoraggianti, per quanto riguarda l'effetto dell'attività fisica nel modificare la comunità microbica. I limiti riscontrati in questa revisione, rendono però difficile interpretare i risultati in maniera oggettiva, in quanto appare impossibile escludere altri cofattori.

## 1.0 INTRODUZIONE

Con il termine microbiota intestinale, si definisce la comunità microbica del tratto enterico, composta da trilioni di microorganismi in grado di svolgere funzioni essenziali per l'ospite: funzioni di tipo metabolico, quindi sintesi di sostanze utili all'organismo, di tipo enzimatico, di protezione, di stimolo verso il sistema immunitario e di eliminazione di sostanze nocive. Inoltre, proprio per queste proprietà, negli ultimi anni si è studiata la correlazione e il ruolo che, la microflora intestinale, ha nelle varie patologie che colpiscono l'uomo. Si è scoperto, infatti, essere in grado di influenzare ed in alcuni casi prevenire, il processo di formazione e il successivo sviluppo di svariate malattie, per fare qualche nome: depressione, cancro e sindrome del colon irritabile. Per questi motivi il microbiota è diventato un campo di estremo interesse medico e farmaceutico, perché, a differenza di alcuni fattori che non sono modificabili e che incidono sull'insorgenza di malattie, il microbiota si può alterare. Le evidenze indicano la dieta e la genetica come principali modificatori della composizione microbica. Anche la somministrazione di antibiotici può determinarne un cambiamento, ma in negativo. Diminuendo cioè la diversità, indicatore di salute, nell'ospite. Non si è invece dimostrato con certezza il ruolo dell'attività fisica nella produzione di un microbiota 'amico'. Lo scopo di questo studio è quindi quello di valutare se l'attività fisica può essere un ulteriore fattore in grado di mutare la comunità microbica e se sì, in che modalità. Precedenti studi condotti sugli animali, dimostrano l'esistenza di una correlazione tra queste due costanti, ma le evidenze sull'uomo sono scarse e molto eterogenee. Per questo motivo ho scelto la *Scoping Review* come modalità di ricerca, in modo da poter dar luce ad un argomento ancora poco studiato ed analizzato ed avere la possibilità di selezionare articoli altrimenti non suscettibili di una revisione sistematica. C'è inoltre stata la volontà di selezionare solamente articoli in cui i partecipanti fossero in salute, evitando in primo luogo, che la patologia stessa potesse influenzare la diversità e dando la possibilità di poter valutare poi, in studi successivi, l'effetto preventivo e di benessere nella salute umana. Infine, per la stesura, sono state seguite come traccia per l'elaborazione, le indicazioni del *PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR)*.

<https://annals.org/aim/fullarticle/2700389/prisma-extension-scoping-reviews-prisma-scrchecklist-explanation>

## 2.0 CAPITOLO 1: IL MICROBIOTA INTESTINALE

Seppure la *Scoping review*, abbia come caratteristica una maggiore risolutezza nella stesura, si è deciso, oltremodo, di realizzare un capitolo introduttivo sul microbiota intestinale, con la volontà di raccogliere informazioni su di un argomento poco conosciuto, in modo da permettere ai lettori, di avere un bagaglio di conoscenza sufficiente per poter interpretare al meglio i risultati e di comprendere, infine, la volontà di affrontare questa tematica in primis.

### 2.1 Definizione

L'intestino umano rappresenta un ecosistema in cui 100 trilioni di microbi, principalmente Bacteria, Archaea ed Eukaryota convivono ed interagiscono con l'organismo ospite, rappresentando un "organo metabolico" capace di influenzare la regolazione di molte funzioni sistemiche, contribuire allo stato di salute, avere un ruolo in molte malattie gastrointestinali (colon irritabile, malattie infiammatorie croniche, diverticolite, cancro del colon) e sistemiche (allergie, obesità, diabete tipo 2, aterosclerosi) (1,2). Il tratto gastrointestinale ospita 3500 differenti specie di batteri che mantengono in condizioni fisiologiche, una relazione simbiotica con l'ospite. Il numero di cellule batteriche è 10 volte superiore al numero delle cellule eucariotiche umane. (3)

### 2.3 Diversità

Il microambiente intestinale favorisce principalmente la crescita di batteri provenienti da sette phylum predominanti: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia e Cyanobacteria. Tra queste, i Bacteroidetes e i Firmicutes costituiscono più del 90% della popolazione totale. La maggior parte delle specie sotto il phylum Bacteroidetes, appartengono ai generi di Bacteroides e Prevotella. Mentre per quanto riguarda le specie batteriche sotto i phylum Firmicutes, i generi più rappresentati sono Clostridium, Eubacterium e Ruminococcus, che sono predominanti nell'intestino. (4) A parte la classificazione tassonomica, il microbiota umano può essere classificato in tre enterotipi, basati sui tre generi più rappresentati: Bacteroides, Prevotella e Ruminococcus. Il primo enterotipo (Bacteroides), è caratterizzato da batteri con attività saccarolitiche e proteolitiche. Il secondo, ricco in Prevotella e Desulfovibrio, degrada le glicoproteine del muco presente sulla barriera mucosale intestinale. L'enterotipo III è caratterizzato dal predominio del Ruminococcus, importante per la sua attività di degradazione della

mucina e di trasporto di zuccheri attraverso la membrana. L'assunzione di proteine animali e di grassi per un lungo periodo, arricchisce l'enterotipo I, mentre una dieta con prevalenza di carboidrati favorisce la Prevotella. (5,6)

## 2.4 Teoria ologenomica

L'abbondanza di phyla batterico può variare significativamente da individuo a individuo, in particolare si può identificare una parte di popolazione come 'microbioti di base' e il restante come un 'pool variabile'. Per una migliore comprensione, è possibile fare un'analogia con il genoma batterico. I genomi batterici sono comunemente divisi in un genoma di base, contenente funzioni e caratteristiche della specie, e un pool genetico flessibile, determinato invece da un'associazione evolutiva più breve, nonché da un'acquisizione attraverso un trasferimento genetico orizzontale. Spesso, le regioni genomiche trasferite orizzontalmente, conferiscono adattamenti specifici di nicchia, come per esempio la resistenza agli antibiotici. Con il tempo, la selezione naturale su questi ultimi elementi, si rivelerà importante per una migliore colonizzazione nell'ospite, tenderà quindi a ridursi la loro mobilità e verrà promosso il loro adattamento al genoma di base. Una struttura simile può definire anche il microbioma intestinale, per cui si avrà: da un lato, un microbiota di base ben adattato all'ospite, determinato da fattori genetici; dall'altro, un pool flessibile di microbi, dipende dalla diversità ambientale e dalle condizioni esterne. I microbioti di base, adattati per la riproduzione, comprendono *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* e *Bacteroides* (< 0,5% di quantità relativa). Mentre gli altri (pool flessibile), provengono solitamente da alimenti ingeriti, acqua e vari componenti dell'ambiente. Questi ultimi sarebbero, quindi, i più facilmente modificabili. Lo scambio di materiale genetico tra base e varianti, conferisce la possibilità di adattarsi ad un nuovo ambiente o ad una nuova dieta. (7)

## 2.5 Composizione

La concentrazione dei microrganismi è molto alta nella cavità orale ed costituita principalmente di sei phylum: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes e Fusobacteria, che rappresentano il 94% della popolazione. In questo tratto lo streptococco è il batterio più rappresentato. (8) Dopo la deglutizione, il cibo viene trasportato verso il basso nell'esofago e per peristalsi raggiungerà lo stomaco. Sono disponibili informazioni limitate sui microbi che abitano l'esofago. Ma come nella cavità orale, il genere più comune è lo *Streptococcus*. (9). Nello stomaco, che in passato si pensava essere sterile a causa del pH estremamente

acido dell'ambiente gastrico, la popolazione batterica è invece presente. Più del 65% dei fitotipi proviene dalla bocca attraverso la costante deglutizione, mentre un'altra porzione raggiunge lo stomaco dal duodeno attraverso l'azione del reflusso. In uno stomaco sano si trovano principalmente 5 Phylum: Solidarie, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobatteri e Proteobacteria e i generi batterici Prevotella, Streptococcus, Veillonella, Rothia e Haemophilus. (10,11) Segue l'intestino tenue, che si divide in tre parti: duodeno, digiuno ed ileo. Il microambiente del duodeno è caratterizzato dal veloce tempo di transito e dalla secrezione di fluidi biliari e pancreatici, che uccidono la maggior parte di batteri ingeriti, limitando così la densità batterica (10<sup>3-4</sup> Unità formanti colonie/ml) e la loro diversità. Firmicutes e Actinobacteria sono i fitotipi predominanti nel duodeno. Nel digiuno la colonizzazione batterica si amplia in termini di diversità e densità (10<sup>3-7</sup> UFC/ml) e supporta principalmente la crescita di aerobi quali Gram-positivi ed anaerobi facoltativi (10<sup>3-7</sup> UFC/ml) tra cui Lactobacilli, Enterococchi e Streptococchi. Si osserva un progressivo aumento nel numero delle specie dal digiuno all'ileo. Qui la densità batterica raggiunge fino a 10<sup>9</sup> UFC/ml, con predominanza di specie aerobiche. Raggiungendo la parte distale dell'ileo, vicino alla valvola ileoceca, si contraddistinguono principalmente anaerobi obbligati e Gram-negativi, come nel Colon. (12)

L'intestino Crasso, che a sua volta si divide in cieco, colon e retto, è caratterizzato da un transito più lento del cibo e dalla sua condizione anaerobica. La densità batterica raggiunge 10<sup>12</sup> CFU/ml ed è dominata principalmente da Firmicutes e Bacteroidetes. Il rapporto di questi due phyla batterici, è considerato un marcatore predittivo della salute nell'uomo. Nel lume sono predominanti: Bacteroides, Bifidobacterium, Streptococcus, Enterobacteriaceae, Enterococcus, Clostridium, Lactobacillus e il Ruminococco; mentre Clostridium, Lactobacillus, Enterococcus e Akkermansia si trovano nella mucosa. Inoltre, alcuni agenti patogeni, tra cui Campylobacter jejuni, Salmonella enterica, Vibrio cholera, E. coli e Bacteroides fragilis possono presentarsi anche se con minore abbondanza (0,1%) (9,13).

## **2.6 Fattori che influenzano la composizione microbica**

### Età

Il microbiota intestinale ha un'ecologia estremamente complessa di organismi, che varia notevolmente tra gli individui stessi e attraverso il tempo, rendendo difficili misurare i cambiamenti legati all'età in sé e per sé. Tuttavia, differenze nella

composizione dei microbi intestinali tra popolazione giovane ed anziana, sono ben distinguibili. (14). Nuove evidenze indicano che già nell'utero il feto potrebbe entrare in contatto ed essere colonizzato da microorganismi, seppure il profilo microbiotico di base sia determinato dal parto e dalla sua modalità. In particolare, con parto autotico si acquisiscono comunità batteriche simili al microbiota vaginale della propria madre: *Lactobacillus*, *Prevotella* e *Sneathia*. Invece, i neonati partoriti attraverso cesario ospitano comunità batteriche simili a quelle che si trovano sulla superficie della pelle: *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, e *Propionibacterium* (15). Nei primi 2/3 anni di vita il microbiota degli infanti appare instabile ed in continuo cambiamento; è con l'introduzione di cibo solido che acquista caratteristiche simili a quelle dell'adulto. (16). Durante l'età adulta, il microbiota risulta abbastanza stabile. E' con l'avanzamento dell'età senile che la composizione tende invece a variare, nello specifico la percentuale di *Bacteroidetes* aumenta e quella dei *Firmicutes* diminuisce; ciò è dovuto principalmente: ad un cambiamento nei gruppi di *Clostridium*, ad un'acquisizione di un minor numero di batteri associati alla salute, come *Bifidobatteri* e ad una formazione di un maggior numero di *Proteobatteri*. (14).

### Dieta

Le prime modulazioni del microbiota intestinale, dopo la modalità del parto, derivano dalla dieta in età neonatale: latte materno o latte in polvere. Diversi studi mostrano una sostanziale differenza nella composizione del microbiota tra queste due modalità di allattamento. Oltre il valore nutrizionale e l'accezione psicologica del latte materno, esso contiene diversi composti bioattivi non presenti nel latte in polvere. Questi composti hanno un ruolo chiave nella digestione, assorbimento, protezione immunitaria e antibatterologica del bambino. In particolare, permette il nutrimento dei commensali batterici nell'infante, portando così ad un vantaggio selettivo di *Bifidobacterium*, non invece presente nei neonati nutriti con latte in polvere. Le evidenze mostrano che diverse specie di *Bifidobacterium*, nello specifico *Bifidobacterium longus subs infantis*, contengono codici genetici unici, in grado di codificare per diversi glicosidasi e trasportatori di carboidrati, capaci di metabolizzare al meglio il latte materno. (17)

La dieta continua ad essere il meccanismo più importante nel determinare la composizione, la diversità e la quantità, anche in età adulta. In generale un grande apporto di frutta, verdure e fibre, è associato ad una maggiore ricchezza e diversità nei

microbioti. Gli individui con questo tipo di dieta hanno una maggiore quantità di organismi del phylum Firmicutes, tra cui Ruminococcus bromii, Roseburia e Eubacterium rectale, capaci di metabolizzare carboidrati insolubili. (18) Recenti studi hanno indicato che una dieta a base di carne animale provoca una diminuzione nella quantità di Firmicutes. Polisaccaridi provenienti da fibre vegetali, sono un indispensabile riserva di energia per il microbiota. Infatti, comparando la composizione della microflora di vegani e onnivori, i primi mostrano maggiori livelli di metaboliti microbici. Anche l'assunzione di lipidi ha effetti sulla composizione del microbiota. Per esempio, la somministrazione di lardo (ricca di acidi grassi saturi) su topi, ha aumentato la quantità di batteri pericolosi come Bilophila, mentre l'assunzione di olio di pesce (ricco di acidi grassi polinsaturi) ha incrementato il numero di batteri benefici come Lactobacillus e Akkermansia muciniphila. (19)

Questo indica che anche piccole modifiche nella dieta, possono avere un impatto sostanziale nella composizione del microbiota. Molti studi hanno, inoltre, dimostrato che ci sono significative differenze a livello geografico e stagionale, ma che a ciò si può associare una conseguenziale differenza nel tipo di dieta. Per esempio, è stato dimostrato che i bambini che abitano le zone più rurali dell'Africa, hanno una maggior quantità di Prevotella, mentre i coetanei europei hanno una maggior proporzione di Bacteroides. Anche se Prevotella e Bacteroides hanno una tassonomia ed una funzionalità simile, un'abbondanza di Prevotella deriva da una dieta principalmente di natura agricola, mentre i bambini europei consumano una dieta ricca di proteine, zucchero e amido e povera di fibre. (20) Inoltre, è stata dimostrata l'abbondanza del phylum Actinobacteria durante gli inverni, rispetto alle stagioni estive. Questo perché, nella popolazione studiata, durante l'inverno la dieta è ricca di carne animale, mentre diventa a base di carboidrati e fibre durante l'estate. (21)

### Antibiotici

Una delle armi più importanti che ha il microbiota 'sano' contro i patogeni, è la possibilità di un'esclusione competitiva di questi ultimi. L'uso di antibiotici può portare ad un'interruzione di questi meccanismi competitivi e come risultato si può avere, ad esempio, un'infezione da salmonella subito dopo l'utilizzo di una terapia antibiotica. Una delle possibili motivazioni per cui si può incappare in questo evento, è la perdita dei meccanismi di interazione tra le diverse specie microbiche, che porta ad una maggior produzione di acido salico, promotore di patogeni come Salmonella

typhimurium and Clostridium difficile. (22) I maggiori cambiamenti nel microbiota dovuti all'assunzione di antibiotici sono la diminuzione della diversità tassonomica e la persistenza, in seguito, delle alterazioni stesse. L'uso di antibiotici di ampio spettro, con copertura predominante per organismi anaerobici (es: *clindamicina*), anche per brevi periodi (7g), porta ad un cambiamento nella diversità dei Bacteroides che non si recupera prima di un arco di 2 anni.(23) Un altro recente studio dimostra invece che una somministrazione per un breve periodo (7 g) di *ciprofloxacina* e *beta-lactamo* porta ad una diminuzione della diversità del 25%, con il numero di specie nella tassonomia di base che passa da 29 a 12, con un aumento nel rapporto tra Bacteroidetes: Firmicutes. (24)

## 2.7 Funzioni

Il microbiota intestinale svolge funzioni differenti nel corpo umano: metaboliche, strutturali, protettive e neurologiche.

### Metabolica

#### *Carboidrati*

Il microbiota intestinale deriva gran parte del proprio nutrimento dai carboidrati. La fermentazione dei carboidrati che sono sfuggiti alla digestione prossimale e quella degli oligosaccaridi indigeribili, da parte di microrganismi come Bacteroides, Roseburia, Bifidobacterium, Fecalibacterium, e Enterobacteria risulta nella sintesi di acidi grassi a catena corta (SCFA), quali butirrato, propionato ed acetato. Gli SCFA hanno funzioni importanti nella fisiologia dell'ospitante: 1) il butirrato è la principale fonte di energia per l'epitelio del colon; 2) l'acetato e il propionato sono metabolizzati dal fegato (propionato) o dai tessuti periferici, in particolare i muscoli (per l'acetato), e hanno un ruolo come modulatori del metabolismo del glucosio e del colesterolo. (25) Inoltre, il butirrato può prevenire l'accumulo di prodotti di scarto tossici come il D-lattato. Infine, organismi come Oxalobacter formigenes, Lactobacillus sp. e Bifidobacterium sp. riducono il rischio di formazione di calcoli renali, contrastando la formazione di Ossalato. (26)

#### *Lipidi*

Il microbiota intestinale ha anche dimostrato di impartire un impatto positivo sul metabolismo dei lipidi, sopprimendo l'inibizione dell'attività della lipasi lipoproteica negli adipotici. Inoltre, è dimostrato che Bacteroides thetaiotaomicron aumenti l'efficienza

dell'idrolisi lipidica, regolando, in positivo, l'espressione di colipasi richiesta dalla lipasi pancreatica per la digestione dei grassi. (27)

### *Proteine*

Il microbiota dispone di proteinasi e peptidasi che sono in grado di lavorare in tandem con le proteinasi umane nel metabolismo proteico. Inoltre, trasportatori sulla membrana cellulare batterica facilitano l'ingresso di aminoacidi dal lume intestinale all'interno dei batteri, dove vengono convertiti in piccole molecole di segnalazione e peptidi antimicrobici (batteriocini). Esempi di questi meccanismi sono: la conversione di L-istidina all'istamina da parte dell'enzima batterico istamina decarboxilasi e del glutammato a  $\gamma$ -amino acido butirrico (GABA) dal glutammato decarboxilasi. (28)

### *Acido biliare*

*Bacteroides intestinalis*, e in una certa misura *Bacteroides fragilis* ed *E. coli*, intervengono nella reazione per cui l'acido biliare primario viene convertito nell'acido biliare deossicolico secondario e in acido licolico, nel colon. (29)

### *Polifenoli*

I metaboliti secondari polifenolici sono presenti in una varietà di vegetali consumati nella dieta. Di questi la maggior parte viene poi assorbita direttamente nell'intestino, intervengono però nuovamente i microbioti per rendere composti attivi i residui polifenolici inattivi. I prodotti attivi finali vengono assorbiti dalla vena porta, per viaggiare poi in altri tessuti e organi, fornendo azioni antimicrobali e altre azioni metaboliche. Un esempio può essere la conversione di isoflavona in equolo, che ha effetti antiandrogenici e ipolipidemicici. (30)

### *Vitamine*

I microorganismi del colon svolgono anche un ruolo nella sintesi di vitamine (B1, B2, B6, B12, PP, H, acido pantotenico e folico) e nell'assorbimento di calcio, magnesio e ferro, questo ruolo è ulteriormente migliorato dalla presenza di SCFA. (31)

### *Farmaci e xenobiotici*

La capacità del microbiota intestinale di metabolizzare xenobiotici e farmaci è oggetto di scrupoloso studio. Un interessante esempio del suo potenziale è la riduzione da parte del microbo  $\beta$ -glucuronidase del farmaco anticancerogeno *Irinotecan*, che può provocare effetti come diarrea, infiammazione ed anoressia. (32)

## Protettiva

Il sistema immunitario si trova in una situazione complicata quando si tratta di regolare l'omeostasi che mantiene un microbiota intestinale sano, in quanto ha bisogno, da una parte, di essere tollerante con i microbioti benefici e dall'altra, di prevenire la crescita di altri patogeni.

Uno dei meccanismi più semplici di protezione antimicrobica adottata dal nostro sistema, è data dalla presenza di uno strato di muco a due livelli, che mantiene così i microbi nel lume lontani dal contatto epiteliale. Questo meccanismo avviene prevalentemente nell'intestino crasso. Qui la mucosa è costituita da una varietà di glicoproteine muciniche, secrete dalle cellule mucipare, che si estendono, fino a un massimo di 150  $\mu\text{m}$  dall'epitelio del colon. Lo strato interno è più denso e non ospita nessun organismo, mentre lo strato esterno è più dinamico e fornisce glicani come fonte di nutrizione agli organismi ospiti. (33) Al contrario dell'intestino grasso, dove la mucosa gioca un ruolo centrale, nell'intestino tenue sono le proteine antimicrobiche che vanno a sostituire uno strato mucosale discontinuo e inadeguato. Qui è il microbiota intestinale, attraverso le sue componenti strutturali e i suoi metaboliti, che induce la sintesi di proteine antimicrobiche (AMP), tramite un meccanismo mediato dai recettori dell'immunità innata (PRR) nelle cellule di Paneth dell'ospitante. Nello specifico i (PRR) sono attivati da pattern molecolari microbici (MAMPs). PRR-MAMP sono implicate in diversi percorsi di segnalazione che sono essenziali per promuovere la normale funzione della barriera mucosale: produzione di AMP, glicoproteine muciniche e Iga. (34) Il microbiota sano sembra essere, in generale, un prerequisito per la produzione AMP, ma sono principalmente *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Lactobacillus innocua*, le specie che ne guidano la produzione. La formazione di AMP avviene anche tramite prodotti del metabolismo batterico come gli SCFA e l'acido litocolico che possono aumentare l'espressione di catelicidina attraverso meccanismi che coinvolgono la deacetilazione istonica e la via metabolica MEK/ERK. Gli AMP agiscono principalmente degradando la membrana esterna, sia dei commensali che dei patogeni. (35)

Un altro meccanismo difensivo che il microbiota ha evoluto, è quello di controllare la crescita dei patogeni inducendo la produzione di immunoglobuline a livello locale. Specialmente organismi Gram-negativi come i *Bacteroides* sono in grado di attivare cellule dendritiche intestinali (DC), che a loro volta inducono plasma-cellule nella

mucosa intestinale a produrre IgA secretorie (sIgA). Questi meccanismi limitano la traslocazione del microbiota dal lume intestinale al sistema circolatorio, impedendo così risposta immunitaria sistemica. (36)

### Immunomodulazione

L'impatto del microbiota sul sistema immunitario dell'ospite rappresenta un'area di ricerca molto attiva. Le informazioni principali, date dallo studio sugli animali, colloca il microbiota all'interno di processi di crescita e della funzionalità del sistema linfatico intestinale, principalmente per i linfociti B e T. A supporto, studi che hanno comparato topi senza microbiota e topi comuni, hanno dimostrato che i topi senza batteri hanno avuto disfunzioni nella formazione dei tessuti linfatici intestinali, come le placche di Payer e follicoli linfatici. Sembra infatti che la formazione iniziale dei linfociti B, che avviene nella mucosa intestinale (come nel fegato del feto e nel midollo osseo), sia regolata anche da segnali extracellulari indotti dai microbioti. Inoltre IgA che producono linfociti B, maturano nelle placche di Payer sotto stimolo dei commensali. Infatti, nello studio sopracitato, le cavie senza germi, hanno decrementato anche il numero di linfociti T helper Th1 e Th17 e T regolatori (Foxp3+). Questa condizione può essere però risolta colonizzando le cavie senza batteri con microbioti intestinali. Nello specifico sembra che alcune specie di Clostridia e Bacteroides, siano in grado di influenzare la formazione dei linfociti T. La microflora sembra inoltre giocare un ruolo nella secrezione delle citochine pro e anti-infiammatorie nei macrofagi, cellule dendritiche e neutrofili. (37)

### Strutturale

L'epitelio intestinale è un singolo strato di cellule colonnari che sono strettamente legate da complessi di giunzione intercellulari che regolano la permeabilità paracellulare. Il complesso di queste giunzioni comprende: giunzioni occludenti, giunzioni aderenti e desmosomi. (38) Ci sono varie evidenze che supportano il ruolo del microbiota nel mantenere la struttura e le funzioni del tratto gastro-intestinale. Per citare alcuni esempi, il Bacteroides thetaiotaomicron è coinvolto nella produzione della proteina sprr2A, necessaria per mantenere i desmosomi nei villi epiteliali. (39) Un altro meccanismo è quello che mantiene le giunzioni occludenti attraverso la mediazione con il recettore TLR2, per mezzo dei peptidoglicani presenti sulla parete cellulare microbica. (40) Inoltre, il Lactobacillus rhamnosus, produce due proteine solubili (p40 e p75), in grado di prevenire l'apoptosi delle cellule epiteliali da parte di citochine

mediate dal recettore del fattore di crescita epiteliale e dalla proteina kinase C. Infine, Studi su cavie private di germi, dimostra che essi hanno una minore superficie intestinale, villi di uno spessore ridotto, un ciclo cellulare più veloce e una peristalsi compromessa. (41,42)

### Neurologica

La comunicazione bidirezionale tra intestino e cervello è meglio conosciuta come *gut-brain axis* (GBA). Le viscere sono connesse al cervello attraverso il Sistema nervoso enterico (ENS) e vengono inoltre coinvolti parallelamente il sistema parasimpatico (attraverso il nervo vago) e il simpatico (gagli prevertebrali) e l'asse ipotalamo-pituitaria-adrenergica (HPA). L'ENS può recepire più di 30 neurotrasmettitori, la maggior parte dei quali si trova nel SNC come acetilcolina, serotonina, dopamina. Più del 90% della serotonina e più del 50% di serotonina prodotta nell'intestino è opera dei microbioti. Metaboliti batterici, in particolare SCFA inducono il triptofano idrolasi nelle cellule enterocromaffini a rilasciare serotonina. (43) Nuove ricerche indicano che la diassiosi del microbiota nei disturbi gastro-intestinali, distrugge il GBA e provoca disturbi dell'umore. Prove sperimentali indicano che i probiotici possono indurre la produzione di agenti nefrotropici nell'ippocampo e nella corteccia celebrale, regolare funzioni cognitive, di riparazione muscolare, rigenerazione e differenziazione. Inoltre, I probiotici possono modulare l'HPA per far ridurre il cortisolo prodotto dalle ghiandole adrenergiche. Minori livelli di cortisolo sono stati associati ad una diminuzione di stress ed ansia. (44) Un recente studio ha dimostrato la correlazione tra l'abbondanza di Bacteroidetes, Proteobacteria and Actinobacteria e la riduzione di Firmicutes con depressione. Il trattamento con probiotici come Bifidobacterium longum NCC3001 è in grado di ridurre sintomi depressivi in pazienti con sindrome del colon irritabile (IBS) e migliorare la loro qualità di vita. Il probiotico non ha avuto effetti sulla sintomatologia del IBS, ma ha ridotto gli stimoli per le emozioni negative in diverse regioni del cervello, compresa amigdala e la regione limbica frontale. (45)

### **2.8 Prebiotici e Probiotici**

L'organizzazione mondiale della salute ha definito i probiotici come 'microrganismi in vita, in grado di apportare benefici alla salute umana se somministrati nelle quantità adeguate. Diverse specie come Lactobacillus casei, Lactobacillus planatarum, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium infantis, Streptococcus thermophilus, E. coli strain Nissle 1917, per

nominarne alcune, hanno dimostrato essere coinvolte nei processi di immunomodulazione e funzionali della barriera intestinale. Queste, come altre specie, sono state commercializzate per la cura di alcune patologie, come la sindrome da colon irritabile e diarrea associata all'uso di antibiotici. Il concetto principale nell'uso di questo trattamento è fornire un armamentario in grado di imitare la fisiologica funzione del microbiota 'amico' nel promuovere salute. La somministrazione di prebiotici può aumentare gli effetti dei probioti. I prebiotici sono definiti come nutrienti che contengono oligosaccaridi non digeribili (es: galattolissacaridi e inulina). Prebiotici e probiotici quando insieme vengono definiti simbiotici. Il microbiota intestinale fermenta selettivamente queste fibre producendo SCFA, portando effetti positivi sulla salute dell'ospitante. (46,47)

## **CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI**

### **2.1 Scopo della ricerca**

Questa revisione si pone l'obiettivo di indagare la letteratura a supporto dell'efficacia dell'attività fisica come fattore in grado di alterare la comunità del microbiota intestinale, in particolare lo sviluppo di un microbiota amico, capace poi di migliorare lo stato infiammatorio, la risposta immunitaria, i processi digestivi e di prevenzione, rispetto a patologie nell'organismo ospite. Ad oggi sono noti gli effetti della dieta nel modificare la composizione del microbiota, l'attività fisica potrebbe rientrare in un regime per cui, avere uno stile di vita sano, modifica positivamente non solo l'individuo in sé, ma anche gli organismi che ospita, traendone così un duplice vantaggio.

### **2.2 Criteri di eleggibilità degli studi**

Dal quesito "l'attività fisica svolta da un adulto sano è in grado di alterare positivamente la composizione del microbiota intestinale?"

Si è estrapolato il seguente PIO:

- P: individui adulti sani
- I: Attività fisica
- O: alterazione della composizione microbica

I criteri di inclusione sono i seguenti:

- Disegni di studio primari e secondari
- Periodo di pubblicazione: dal 01/01/2017 al 31/08/2020
- Lingua: inglese, italiano

I criteri di esclusione sono i seguenti:

- Articoli con titolo ed abstract non pertinenti
- Soggetti non sani o con patologie pregresse
- Altri interventi oltre l'attività fisica, come probiotici o dieta
- Dieta dei partecipanti non soggetta a controlli
- Disegni di studio: qualsiasi tipologia tranne studi primari e secondari
- Periodo di pubblicazione: antecedente al 01/01/2017 o successivo al 31/08/2020
- Lingua: tutte le lingue, tranne inglese e italiano

### **2.3 Informazione sulle fonti di ricerca**

Il periodo di ricerca è iniziato nel maggio 2020 e si è protratto fino a settembre 2020. Sono state consultate le principali banche dati elettroniche: *PubMed*, *The Cochrane Library (Cochrane Central Register of Controlled Trials)* e *PEDro (Physiotherapy Evidence Database)*. Non sono stati contattati autori per identificare ulteriori fonti. L'ultima ricerca è stata eseguita il giorno 28/09/2020.

### **2.4 Strategie di ricerca**

Le parole chiave utilizzate per la ricerca sono le seguenti:

- *Physical exercise*
- *Aerobic exercise*
- *Physical activity*
- *Cardiorespiratory fitness*

- *Gut microbiota*
- *Microbiome*
- *Adult*
- *Human*
- *Probiotics*
- *Diet*

Le parole-chiave sono state poi combinate tramite gli operatori booleani AND e OR e NOT.

- La stringa di ricerca formulata, uguale per le banche dati Cochrane e Pubmed, è stata la seguente:

*("physical exercise" or "physical activity" or "aerobic exercise" or "cardiorespiratory fitness") and ("gut microbiota" or "microbiome") and adult and human and not (diet or probiotic)*

- Mentre per PEDro è stata utilizzata la seguente:

*exercise microbiota*

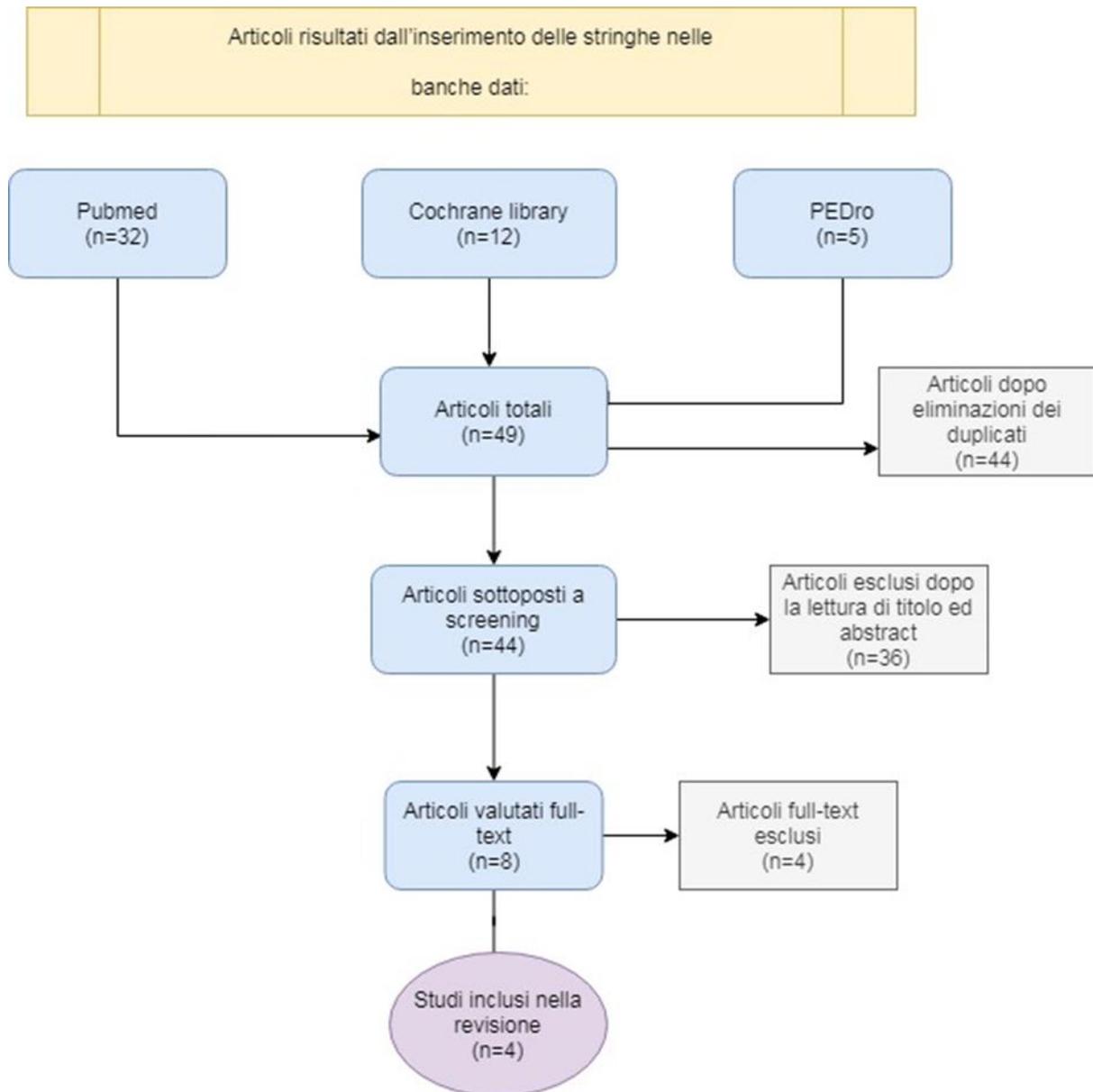
Si è poi proceduto alla selezione tramite l'eliminazione dei duplicati, seguita dalla lettura di titolo e *abstract* pertinenti. Successivamente per completare la selezione è stato effettuato un ulteriore screening tramite la lettura del testo intero.

## **CAPITOLO 3: ANALISI CRITICA DELLA LETTRATURA**

### **3.1 Identificazione e selezione degli studi**

Il processo di selezione degli studi è riportato nel seguente diagramma di flusso (fig. 1), creato secondo le indicazioni del *"Preferred Reporting for Systematic Reviews and Meta-Analyses"* (PRISMA).

Diagramma di flusso (fig. 1)



La ricerca ha prodotto 49 risultati di cui 32 su Pubmed, 12 su Cochrane e 4 su PEDro. In seguito all'eliminazione dei doppi, sono stati sottoposti a screening del titolo e lettura dell'abstract rimanenti articoli (44). Di questi ne sono stati ulteriormente esclusi 36, poiché non corrispondevano ai criteri di eleggibilità. I restanti 8 articoli sono stati valutati tramite la lettura del full-text. In conclusione, sono stati individuati 1 RCT, 1 clinical trial e 2 case Report che soddisfano i criteri di eleggibilità

### 3.2 Strumenti di valutazione della qualità metodologica

La valutazione della qualità metodologica non è un requisito della *scoping review*, è stato però lo stesso scelto di analizzare i clinical trial selezionati, utilizzando la scala PEDro (Tabella 2).

**Tabella 2.** Analisi della qualità metodologica dello studio di Emiko Morita et al (48) e di Hirokazu Taniguchi et al (49)

ITEM	Emiko Morita et al (48)	Hirokazu Taniguchi et al (49)
1. I criteri di eleggibilità sono stati specificati?	Si	Si
2. I soggetti sono stati assegnati in maniera randomizzata ai gruppi?	No	Si
3. L'assegnazione dei soggetti era nascosta?	No	Si
4. I gruppi erano simili all'inizio dello studio per quanto riguarda i più importanti indicatori prognostici?	Si	No
5. Tutti i soggetti erano "ciechi" rispetto al trattamento?	No	No
6. Tutti i terapisti erano "ciechi" rispetto al tipo di trattamento somministrato?	No	No
7. Tutti i valutatori erano "ciechi" rispetto ad almeno uno degli obiettivi principali dello studio?	No	No
8. I risultati di almeno un obiettivo dello studio sono stati ottenuti in più dell'85% dei soggetti inizialmente assegnati ai gruppi?	Si	Si
9. Tutti i soggetti analizzati al termine dello studio hanno ricevuto il trattamento (sperimentale o di	Si	Si

controllo) cui erano stati assegnati oppure, se non è stato così, i dati di almeno di uno degli obiettivi principali sono stati analizzati per “intenzione al trattamento”?		
10. i risultati della comparazione statistica tra i gruppi sono riportati per almeno uno degli obiettivi principali?	Si	Si
11. lo studio fornisce sia misure di grandezza che di variabilità per almeno uno degli obiettivi principali?	Si	Si
PUNTEGGIO TOTALE	5/11	7/11

Gli articoli: *Four men in a boat: Ultra-endurance exercise alters the gut microbiome*(68) e *Rapid gut microbiome changes in a world-class ultramarathon runner*(69), non sono stati valutati in quanto case Report. Questa scelta è stata presa, rispettando i criteri della della PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR).

### 3.2 Descrizione degli studi

#### Articolo 1

Titolo: *Aerobic Exercise Training with Brisk Walking Increases Intestinal Bacteroides in Healthy Elderly Women* (48)

Autori: Emiko Morita, Hisayo Yokoyama, Daiki Imai, Ryosuke Takeda, Akemi Ota, Eriko Kawai, Takayoshi Hisada, Masanori Emoto, Yuta Suzuki e Kazunobu Okazaki

Rivista: *Nutrients*

Anno di pubblicazione: 2019

Disegno di studio: *clinical trail*

Obiettivo dello studio: Esaminare gli effetti dell'intervento dell'attività fisica nella composizione del microbiota intestinale in donne anziane in salute.

Popolazione: 32 donne sedentarie ed in salute con età, di età 65 anni o maggiore. Prima di questo studio nessuno dei soggetti ha svolto esercizi per più di un'ora la settimana. Le applicanti allo studio con storia di patologie: cardiache, infarti, ictus, severa ipertensione, diabete o disordini neuropsichiatrici sono stati escluse. Inoltre, le partecipanti selezionate sono state sottoposte ad un ulteriore parere medico.

Misure di outcome: misure dello stato base sono state rilevate a partire da una settimana prima dell'inizio dell'intervento, nello specifico: composizione corporea, abilità motoria, analisi cliniche e questionari sull'attività fisica dieta e modalità di evacuazione. Anche campioni delle feci sono stati raccolti prima dell'inizio del programma. Queste misure sono state poi valutate nuovamente entro una settimana dalla conclusione dell'intervento. L'analisi dei campioni di feci per valutare la composizione microbica è avvenuta utilizzando il sequenziamento di 16 rRNA, confrontandosi con il '*Human Fecal Microbiota T-RFLP profiling*', la classificazione è stata poi divisa in 10 gruppi, tra cui: Bifidobacterium, Lactobacillales, Bacteroides, Prevotella, Clostridium cluster IV, Clostridium subcluster XIVa, Clostridium cluster IX, Clostridium cluster XI, Clostridium cluster XVIII. Per la composizione corporea è stato utilizzato il BMI (peso/altezza<sup>2</sup>). Il Kraus-Weber (K-W) test modificato è stato utilizzato per valutare la forza muscolare del tronco. Sviluppato negli anni 50, valuta forza e resistenza del tronco, per un punteggio totale di 40. Il fitness cardiorespiratorio è stato valutato tramite il 6MWT: il soggetto deve camminare avanti e indietro su di un percorso di 25m il più velocemente possibile per un periodo totale di 6 minuti. Il tutto deve essere svolto sotto supervisione medica. Sono permesse pause e l'istruttore deve incoraggiare, con frasi di incitamento, il partecipante. Il risultato è il totale dei metri percorsi. I parametri dell'attività fisica includono il numero di passi e il tempo speso camminando veloce all'intensità di 3 MET o più, l'accelerometro (assegnato ai partecipanti) ha inoltre calcolato automaticamente anche l'energia spesa (EE)=1,05x MET x Tempo speso x peso corporeo.

Intervento: I soggetti sono stati divisi su base volontaria in due gruppi: AE e TM. Il Gruppo TM ha svolto un'ora di allenamento in gruppo una volta alla settimana per 12 settimane, con esercizi mirati a rinforzare i muscoli del tronco. Tutti gli allenamenti si sono svolti in palestra con la supervisione di un istruttore. I soggetti erano inoltre istruiti a lavorare a casa ogni giorno. Lo svolgimento dell'allenamento, sia a casa che in presenza, è stato registrato e documentato dall'istruttore.

I partecipanti del gruppo AE invece sono stati istruiti a svolgere 60 minuti di camminata veloce ad una intensità  $\geq 3$ MET tutti i giorni per 12 settimane. I soggetti hanno indossato un accelerometro, per monitorare la quantità di passi giornalieri e il tempo speso per l'allenamento. Un istruttore ha condiviso poi una volta alla settimana i risultati registrati dall'accelerometro coi partecipanti e gli ha incoraggiati ad aumentare il passo il più possibile ed in maniera graduale.

Analisi statistica: I dati sono rappresentati come mediane e intervalli interquartili. Solo le P con un valore minore di 0.05 sono state considerate statisticamente significative.

Risultati: 2 partecipati del gruppo TM e 1 nel gruppo AE sono stati esclusi dallo studio. Sono stati considerati quindi, un totale di 12 partecipanti nel gruppo TM e 17 in quello AE. La mediana dell'età è di 70 anni per entrambi i gruppi. I partecipanti del TM hanno partecipato al 90% o più degli allenamenti preposti. Il numero di passi, come il tempo speso camminando veloce e l'energia spesa per l'allenamento (EE), sono aumentate in maniera significativa solamente nel gruppo AE. Mentre l'energia totale spesa è aumentata nel Gruppo AE e diminuita in quello TM. Il valore del K-W test e del 6MWD sono aumentati in maniera simile in entrambi i gruppi. Dopo gli interventi, nel gruppo AE la quantità relativa dei Bacteroides è aumentata in maniera significativa, mentre quella del Clostridium subcluster XIVa è diminuita. La quantità relativa del Clostridium cluster IX è invece aumentata solo nel gruppo TM. Le altre specie microbiche sono rimaste invariate. Anche se un miglioramento del 6MWD è stato osservato in ogni gruppo, un aumento significativo di Bacteroides è stato trovato solo nel gruppo AE. Per questo, il Gruppo AE è stato diviso in due, a seconda che i partecipanti abbiano o meno aumentato il tempo dell'allenamento di circa 20 minuti (come suggerito dagli istruttori). Il risultato è che  $\Delta\%$ Bacteroides nei partecipanti che hanno aggiunto 20 minuti è maggiore rispetto a chi non lo ha fatto (9.7% vs. -3.5%).

Discussione. In questo studio si è dimostrato che un programma di 12 settimane di camminata veloce eseguita ogni giorno, ha aumentato la quantità relativa di Bacteroides, contribuendo inoltre al fitness cardiorespiratorio e senza cambiamenti nel tipo di dieta e nutrienti integrati. In particolare, l'aumento dei Bacteroides si è notato maggiormente in chi ha aggiunto ulteriori 20 minuti di camminata al proprio allenamento. In precedenza, si era già studiato sugli animali, tendenzialmente roditori, che l'esercizio fisico modulava in positivo la composizione di Bifidobacterium and

Lactobacillus, promotori di salute. E in negativo quella del Turicibacter spp, associato a disfunzioni del sistema immunitario e alla sindrome del colon irritabile. Un altro recente studio sui topi ha dimostrato che un programma di corsa sul tapis roulant di 6 settimane, ha aumentato la quantità di Bacteriodes. In generale si può sostenere che l'esercizio aerobico possa modificare il microbiota intestinale in donne anziane in salute. Perciò collegandosi ad altri studi, il mantenimento di un buon microbioma, può essere considerato un fattore di prevenzione per varie patologie. Il meccanismo per cui l'esercizio aerobico sia in grado di alterare la composizione microbionica, può essere dovuto alla variazione del tempo di transito nel colon e il conseguenziale cambiamento del Ph nel lume. Nello specifico, un tempo di transito prolungato porta ad una limitata diversità nella composizione del microbioma, questo coincide con un innalzamento del Ph durante il transito dal colon prossimale a quello distale. L'esercizio aerobico è in grado di abbassare il tempo di transito intestinale in persone sane. Inoltre, l'esercizio fisico aumenta la concentrazione nelle feci di SCFA che diminuiscono il Ph nel lume. I Bacteroides, infatti prediligono ph leggermente acido (pH 6,7), mentre nel lume colonico risulta normalmente di 5,5 (Ph). La specie dei Bacteroides, infine, varia il contributo per l'ospite tra positivo e negativo, a seconda dell'ambiente intestinale in cui si trova. Per esempio, può avere un'azione protettiva rispetto alla sindrome del colon irritabile, come può promuovere la suscettibilità a patologie allergiche croniche. La sua presenza in ridotte quantità è però associata ad obesità e sindromi metaboliche.

Alcune limitazioni in questo studio dovrebbero essere prese in considerazione. Primo, questo non è uno studio randomizzato e il gruppo di partecipanti potrebbe essere insufficiente per valutare a pieno la differenza tra i due programmi e il valore degli outcomes. In secondo luogo, pur confermando la sedentarietà dei partecipanti, l'energia spesa in allenamento dal gruppo AE ad inizio intervento, è maggiore del gruppo TM. Infine, è stato impossibile valutare la diversità del microbioma in rapporto all'attività fisica. Questo perché i campioni di feci sono stati classificati per solo 10 gruppi di microbioti intestinali. Una maggiore diversità si è studiata avere benefici sulla salute dell'ospite, ma per determinarla serve una classificazione in almeno diverse centinaia di gruppi.

Conclusioni: Svolgere camminata veloce come esercizio aerobico, ponendosi l'obiettivo di aumentare il tempo dell'allenamento, può incrementare il numero di

Bacteroides, oltre che migliorare il fitness cardiorespiratorio in donne anziane in salute. L'esercizio fisico può essere una soluzione pratica al migliorare la composizione microbica. Altri studi devono essere condotti per chiarire il meccanismo per cui l'esercizio alteri la composizione del microbiota.

## **Articolo 2**

Titolo: *Effects of short-term endurance exercise on gut microbiota in elderly men* (49)

Autori: Hirokazu Taniguchi, Kumpei Tanisawa, Xiaomin Sun, Takafumi Kubo, Yuri Hoshino, Masahito Hosokawa, Haruko Takeyama e Mitsuru Higuchi

Rivista: *Physiological Reports*

Anno di pubblicazione: 2018

Disegno di studio: RCT

Obiettivo dello studio: valutare se esercizi di resistenza possono modulare il microbiota intestinale nei soggetti anziani, e se questi cambiamenti sono associati con fenotipi cardiometabolici.

Popolazione: 33 uomini anziani giapponesi (62-76 anni). I partecipanti non avevano diagnosi di: diabete, patologie cardiovascolari, cancro, patologie renali croniche o malattie autoimmuni. Sono stati inclusi soggetti che hanno mantenuto un simile stile di vita, dieta e peso negli ultimi 10 anni.

Misure di outcome: il livello di fitness cardiorespiratorio è stato valutato tramite la misurazione del picco di VO<sub>2</sub>. I partecipanti hanno pedalato su di un cicloergometro con un carico di 40-60 W, che è cresciuto di 30 W ogni 3 minuti fino allo sfinimento del soggetto. Il livello di VO<sub>2</sub> maggiore registrato durante la prova è stato considerato il picco di VO<sub>2</sub>. La dieta è stata recensita attraverso la somministrazione di un questionario sulle abitudini alimentari. E' stato misurato anche il battito cardiaco, attraverso l'uso di un elettrocardiografo, per determinare che i partecipanti raggiungessero il livello di intensità richiesto. Misurati anche i valori attraverso analisi del sangue di: aspartato transaminasi (AST), Alanina transaminasi (ALT), Gammaglutamiltransferasi (c-GTP), e della concentrazione di trigliceridi, emoglobina glicata, glicemia e insulina a digiuno. Anche pressione brachiale sistolica (SBP) e

diastolica (DBP) sono state misurate con un oscillometro. Campioni delle faci sono stati raccolti ad inizio e fine intervento (5 settimane), come a 5 settimane dalla conclusione del programma, e sono state sottoposte a sequenziamento di 16 rRNA.

Intervento: I partecipanti sono stati sottoposti ad un programma di esercizi aerobici di 5 settimane sotto supervisione. Gli esercizi comprendevano 3 allenamenti col cicloergometro a settimana, con l'intenzione di incrementare l'intensità raggiungendo il 60% del picco di VO<sub>2</sub> nella prima settimana, 70% nelle settimane 2-3 e il 75% nelle ultime due settimane. La durata delle sessioni è stata di 30 minuti nelle prime due settimane e di 45 minuti nelle ultime 3. Inoltre è stato richiesto di raggiungere una media di battito cardiaco ( $159 \pm 18$  battiti/min).

Analisi statistica: Tutte le misurazioni e i valori calcolati sono stati presentati come deviazione standard, media o mediana (intervallo interquartile). Il livello di significatività statistica è stato impostato su  $P < 0,05$ .

Risultati: 2 Partecipanti sono stati esclusi (infortunio e probabile uso di antibiotici). Il totale dei risultati mostrerà quindi i dati di 31 partecipanti. Dalle analisi risulta che i livelli HDL siano aumentati, mentre quelli del grasso intraepatico (CAVI) ed emoglobina glicata (HbA1c) siano diminuiti. Si dichiara che questi cambiamenti non siano dovuti alla dieta. Nessuna delle variazioni degli indici di diversità Alpha (diversità nella ricchezza tassonomica) e Beta (diversità nelle specie tra le comunità dei diversi campioni) è stata trovata tra l'esercizio e periodi di controllo. Da segnalare che eventuali cambiamenti in Alpha diversità sono stati correlati negativamente con la pressione brachiale sistolica (SBP) e pressione diastolica (DBP). Si è verificato un aumento di Oscillospira da non considerare più significativo dopo alcuni accorgimenti presi sulla dieta dei partecipanti, risulta inoltre essere aumentata solo in uno dei due gruppi analizzati. Invece significativa è la diminuzione del Clostridium difficile, sia nel primo, che nel secondo gruppo. Anche se i cambiamenti nella quantità di Oscillospira non sono stati particolarmente significativi, si è potuta determinare però una loro correlazione positiva con i cambiamenti di HDL e negativa con quelli di HbA1c e della percentuale di grasso corporeo. Mentre variazioni nella quantità di C. difficile sono state correlate positivamente con cambiamenti in SBP, CAVI, AST, ALT e HbA1c e negativamente con cambiamenti nel picco di VO<sub>2</sub>, colesterolo totale e LDL. Le funzioni metagenomiche dei microbioti sono risultate variare con l'esercizio fisico, in

particolare, le componenti collegate all'elaborazione delle informazioni genetiche e del 'Metabolismo dei Nucleotidi' sono state sovra-rappresentate nel periodo di esercizio.

Discussione: Durante il programma di 5 settimane non sono stati osservati significativi cambiamenti nell'Alfa e Beta diversità. L'esercizio ha aumentato la quantità di Oscillospira e diminuito quella di C. difficile. I risultati rivelano anche un ruolo dell'esercizio fisico nelle attività di modulazione delle funzioni metaboliche intestinali. L'esercizio fisico non partecipa quindi da protagonista nella variazione del microbioma, come invece la genetica dell'ospite e la sua dieta. Anche se l'Alpha-diversità non è stata influenzata dall'esercizio, un suo incremento è stato associato ad un abbassamento della pressione sistolica e diastolica SBP and DBP, particolarmente durante il programma di allenamento. E' stato ipotizzato che la responsabilità dell'intestino migliori la pressione sanguigna. Questo può essere dovuto all'interazione tra gli SCFA prodotti dai microbioti e i recettori per gli SCFA presenti nell'ospitante. La quantità relativa di Oscillospira è aumentata durante queste 5 settimane. Studi precedenti hanno correlato positivamente questo microbiota con un metabolismo magro ed è stata dimostrata una sua diminuzione nella sua quantità in individui affetti dal morbo di Crohn e da statoepatite non alcolica. I risultati indicano che l'Oscillospira ha un ruolo benefico sulla salute dell'ospite. Questo studio ha rivelato che cambiamenti nell'abbondanza di Oscillospira sono correlati all'aumento nel livello di HDL e nella diminuzione in HbA1c durante il periodo di intervento con esercizio fisico. Considerando la difficoltà nella cultura dell'Oscillospira, impossibilitando quindi il suo probiotico, sarebbe interessante e necessario, investigare l'effetto di prebiotici e/o trapianto microbico fecale sull'Oscillospira, e nel caso, valutare il suo effetto preventivo sulle patologie cardiometaboliche.

Clostridium difficile, è la maggior causa di diarrea di origine infettiva, ciò è dovuto alla produzione di tossine nell'intestino dell'ospitante. Le sue infezioni sono state epidemiche a livello mondiale, principalmente in pazienti anziani e ospedalizzati. Al momento, che l'attività fisica alteri la composizione del C. difficile non è dimostrato. In questo studio, 5 settimane di esercizio fisico hanno ridotto in maniera significativa la quantità di Clostridium difficile. I risultati indicano che l'esercizio fisico è in grado di diminuire la produzione di tossine da parte del C. difficile. Inoltre, la diminuzione di questo microbiota, è stata associata ad un aumento nel picco di VO<sub>2</sub> e un decremento nel CAVI e nella HbA1c durante l'intervento. Sono anche stati rivelati cambiamenti tra

diversi metagenomi durante il periodo di intervento e quello controllo. In particolare, le componenti collegate all'elaborazione delle informazioni genetiche e del 'Metabolismo dei Nucleotidi', sono state sovra-rappresentate nel periodo di esercizio. Questo può indicare che l'esercizio fisico sia capace di intensificare un ricambio genetico nel DNA batterico e nella sintesi di proteine, le quali possono essere utilizzate per adattarsi meglio ai cambiamenti indotti dall'esercizio sull'ambiente intestinale. Altri studi devono essere condotti per valutare se questi cambiamenti metagenomici hanno effetti benefici sui fattori di rischio cardiometabolici ed infiammatori.

Questo studio presenta diverse limitazioni. Dato che vengono presi in esame solamente uomini anziani in salute, è necessario valutare l'effetto dell'esercizio fisico sul microbioma in popolazioni più ampie, includendo maschi e femmine di età differenti e con diverse condizioni cardiometaboliche. Inoltre, non è stata controllata l'influenza della dieta, seppure sia stata valutata attraverso un questionario; cambiamenti durante l'intervento non sembrano però aver influenzato i risultati dello studio. Deve essere eseguito uno studio dove la dieta viene controllata per determinare l'effetto del solo esercizio fisico. La relativa brevità dell'intervento (5 settimane) rappresenta una limitazione. Ciò perché, potenziali cambiamenti nel microbioma, possono richiedere mesi o anni di esercizio regolare per manifestarsi ed, effetti a lungo termine andrebbero studiati in futuro. Inoltre, sebbene siano stati analizzati i profili metagenomici attraverso un sequenziamento dei geni 16S rRNA, non sono stati analizzati direttamente attraverso un sequenziamento del genoma. Ulteriormente, non sono stati misurati i metaboliti, nei campioni delle feci e nel plasma, che vengono prodotti dai microbioti e che influenzano il fenotipo dell'ospitante. Un sequenziamento del genoma e un'analisi comprensiva del metaboloma, potrebbero approfondire il ruolo dell'esercizio fisico sulle funzioni microbiche ed evidenziare i meccanismi dell'effetto benefico dello stesso sulla prevenzione delle patologie cardiometaboliche, attraverso i microbioti e i suoi metaboliti.

Conclusioni: In conclusione, questo studio crossover randomizzato compara cambiamenti nel microbioma tra i diversi individui. I risultati rivelano che un programma di esercizio fisico di breve durata non influenza in maniera apprezzabile la diversità e la composizione microbica, anche se piccoli cambiamenti sono stati associati alla diminuzione di fattori di rischio cardiometabolici. Inoltre, analisi preliminari, indicano alcuni cambiamenti nelle funzioni metagenomiche durante il periodo di intervento.

Queste scoperte, evidenziano reali ed ipotizzabili funzioni del microbioma ed indicano il microbiota come un mediatore per il benessere cardiometabolico. Altri studi, sia in larga scala, che a lungo termine, devono delucidare la relazione tra esercizio fisico e microbiota intestinale e rivelare il ruolo benefico del microbioma nel prevenire patologia cardiometaboliche.

### **Articolo 3**

Titolo: *Four men in a boat: Ultra-endurance exercise alters the gut microbiome.* (50)

Autori: David M. Keohanea, Trevor Woods, Pat O'Connor, Sean Underwooda, Owen Cronina, Ronan Whistonf, Orla O'Sullivan, Paul Cotter, Fergus Shanahana, Michael G.M Molloya.

Rivista: *Journal of Science and Medicine in Sport*

Anno di pubblicazione: 2019

Disegno di studio: case report

Obiettivo dello studio: Esplorare gli effetti di un prolungato ed intenso esercizio fisico sul microbioma intestinale di 4 atleti ben allenati, che hanno completato senza aiuti una traversata transatlantica.

Popolazione: 4 atleti di sesso maschile, in salute e ben allenati

Misure di outcome: Per valutare il fitness cardiorespiratorio è stato eseguito un '7 x 4 min step test' progettato dall'istituto dello sport australiano ed eseguito su di un ergometro per canottaggio, raccolto inoltre durante questa prova il picco di VO<sub>2</sub>. Questi parametri sono stati rilevati pre e post gara. Campioni di feci sono stati raccolti: pre-gara, a metà, prima della conclusione e a 3 mesi di distanza, per poi essere sequenziati. Infine, la dieta è stata valutata e controllata attraverso la somministrazione di un questionario (FFQ) composto da 146 item nel pre-gara e attraverso la segnalazione e registrazione dei pasti svolti a bordo.

Intervento: Una gara di canottaggio transatlantica di 4998.55(km) da La Gomera (isole Canarie) ad Antigua(Caraibi) della durata di 33 giorni e 22 h, con una distanza media percorsa giornalmente di 151.8 km (82 nmi). Il Gruppo di 4, diviso in due coppie, si è alternato ogni 2 h per un totale di 394.9 h per ciascun atleta.

Risultati: Sono stati registrati modesti livelli di fitness aerobico, con una media di VO2 Max di 48.16 ml/kg/min, prima della gara. Si sono mantenuti con una media di VO2 Max of 46.7 ml/kg/min, due settimane post-intervento. Gli atleti hanno aumentato il numero di calorie da ingerire da 6 settimane prima della traversata, per un totale di circa 20.5 MJ al giorno. La dieta di 6 settimana pre-gara e quella a bordo è rimasta simile nella divisione proteica (18,7%-14,95%), lipidica (23,4%-17,9%), dei carboidrati (57,9%-67,15%) e fibrosa (21,45g/d-23,1g/d) del contenuto. Crescita nell'Alfa diversità si è osservata in tutti gli atleti, a parte il terzo, al quale sono stati somministrati antibiotici. Nei restanti 3 atleti, la diversità è stata evidenziata dal 17esimo giorno ed è continuata fino alla conclusione della gara. A 3 mesi dalla gara si è misurata, una reversione parziale in 2 atleti e totale nell'ultimo, dell'acquisita diversità microbiotica. Dorea longicatena, Roseburia hominis e membri non classificati del genere Subdoligranulum sono aumentati in tutti e 4 gli atleti, mentre Bacteroides finegoldii è risultato essere diminuito. Nell'atleta II, Prevotella copri risulta essere incrementata, da quasi non profilabile, ad essere rappresentata in grande quantità. Si evidenzia una sovrabbondanza nella rappresentazione di vie metaboliche per la produzione di aminoacidi (l-isoleucina, l-lisina), alcune specifiche catene di media e lunga grandezza di acidi grassi (oleate, cis-vaccinato, acido palmitoelico e dodecanoato), come per la sintesi di S-adenil metionina.

Discussione: La diversità nel microbiota è considerato un parametro di salute. Altri hanno parlato di Alpha diversità ed esercizio fisico, nessuno in ambito di tale durata ed intensità. Inoltre, quanto tempo serve per indurre questi cambiamenti attraverso l'esercizio, non è ancora dimostrato. In questo caso, un'alterazione si è potuta notare dal 17esimo giorno ed è continuata fino alla fine della gara. Questo valore è rimasto indipendente dal fitness cardiorespiratorio, misurato con l'indice VO2. Due Atleti hanno mantenuto alcuni indici nell'Alpha diversità acquisita fino a 3 mesi di distanza dalla gara, l'altro atleta è tornato, invece, nello stesso tempo, ai livelli pre-gara. L'ultimo ha subito un calo, invece, dovuto all'assunzione di antibiotici. Il suo microbiota è tornato ai livelli pre-gara sempre in un tempo di 3 mesi. Va considerato anche l'impatto che la dieta può aver avuto nel cambiamento della microflora intestinale. Seppure il dosaggio di macronutrienti sia rimasto simile nel pre e durante la gara, l'impatto del cibo surgelato o essiccato utilizzato a bordo, in particolare nell'apporto di fibre, è da verificare meglio. Le specie batteriche maggiormente incrementate sono Roseburia

hominis, e membri del genere *Subdoligranulum*, entrambi produttori di butirrato. Il butirrato è un SCFA, che gioca un ruolo importante nella regolazione dell'intestino, riducendo infiammazione, stress ossidativo, oltre che rinforzare la barriera epiteliale e moderare la sensibilità viscerale. E' incrementata anche la *Dorea longicatena*, capace di migliorare il metabolismo intestinale, oltre che essere correlata positivamente con la sensibilità dell'insulina. Insieme ad variazione nell'Alpha diversità, alcuni cambiamenti anche nella genetica metabolica sono avvenuti. La quantità relativa dei geni coinvolti nella biosintesi S-adenil metionina (SAME), è aumentata e si è mantenuta nei 3 mesi successivi, in particolare nei microbioti: *Prevotella copri*, *B. vulgatus*, *F. prausnitzii*, *B. uniformis* and *E. rectale*. SAME è coinvolta nel metabolismo degli acidi nucleici e delle posiamnasi, nel processo di crescita cellulare, sopravvivenza e proliferativo ed è il precursore del Glutathione. Il glutathione ha varie proprietà: antiossidante, detossificante degli xenobioti e regolatrice della proliferazione cellulare e della risposta immunitaria. Ma forse il più importante è il ruolo antiossidante, data la grande quantità di stress ossidativo provocata dall'esercizio ad alta intensità. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che la lisina prodotta dai microbioti contribuisce in maniera significativa sul totale di proteine nel corpo umano. Altre evidenze mostrano che cambiamenti nella reperibilità degli aminoacidi influenza l'ematopoiesi, portando ad un aumento nella capacità di trasportare ossigeno e un miglioramento nel fitness cardiorespiratorio. La quantità relativa delle vie metaboliche coinvolte nella produzione di acidi grassi a media e corta catena, sono aumentate in questo studio. In particolare, *cis*-vaccinato, oleato, acido palmitoelico e 5-dodecanoato. Molti acidi grassi vengono convertiti in energia attraverso un processo ossidativo, mentre altri possiedono funzioni specifiche. Il *cis*-vaccinato come l'acido palmitoelico, sono grassi insaturi Omega 7 che sono coinvolti nella lipogenesi, nel metabolismo catabolico e nella sintesi di esteri, trigliceridi e fosfolipidi. Inoltre, gli omega 7 sono riconosciuti per le loro proprietà antiinfiammatorie. Analogamente, l'oleato (estere dell'acido oleico, grasso insaturo omega 9), ha proprietà antiinfiammatorie e funzioni nella salute metabolica e immunitaria. Ulteriori studi andrebbero condotti per una migliore comprensione sugli effetti benefici di questi prodotti, in ogni caso risultano essere benefiche durante l'esercizio prolungato e intenso.

Controllare la dieta è la sfida più difficile quando si parla di correlazione tra esercizio fisico e microbiota. Mentre obiettivamente, l'energia assunta, la composizione dei

macronutrienti e delle fibre ingerite è rimasta simile nel pre ed intra-gara, la costituzione del cibo stesso non lo era è stata. Ciò rappresenta un limite. In secondo luogo, anche un numero così ridotto di partecipanti deve essere considerato un limite. Questo studio dimostra che nell'uomo l'attività fisica influenza positivamente la comunità microbica, è da considerare però, interpretando questi articoli, che gli atleti in questione siano sottoposti a sforzi fisici di questa portata frequentemente.

Conclusione: Questo studio è il primo a dimostrare che l'esercizio ad alta intensità incrementa la diversità microbica, la proliferazione di specie, che producono butirrato ed influenza in positivo il potenziale metabolico di alcuni geni con funzionalità specifiche in atleti ben allenati. Questi cambiamenti sono stati valutati in contesto in cui la dieta differiva nella sua composizione, ma rimaneva simile nel contenuto di energia, macronutrienti e fibre. Inoltre, le modificazioni sono avvenute in assenza di un miglioramento nel fitness cardiorespiratorio. Queste scoperte hanno migliorato la comprensione dei meccanismi per cui il microbiota risponde all'allenamento aerobico sostenuto e di come questo possa avere implicazione per atleti che competono in eventi ad alta intensità. Altri studi devono però essere sostenuti per approfondire l'argomento.

#### **Articolo 4**

Titolo: *Rapid gut microbiome changes in a world-class ultramarathon runner (51)*

Autori: Gregory J. Grosicki, Ryan P. Durk, James R. Bagley

Rivista: *Physiological Reports*

Anno di pubblicazione: 2019

Disegno di studio: *Case Report*

Obiettivo dello studio: esplorare gli effetti di intensa attività fisica sul microbiota intestinale

Popolazione: ultramaratoneta 32enne di sesso maschile

Misure di outcome: Misurate altezza, peso e composizione corporea 21 e 5 settimane prima della gara. Valutato anche il picco di VO<sub>2</sub>, facendo correre l'atleta su di un tapis roulant, con una velocità di partenza di 80m/min che incrementava del 2% ogni 2 min

fino sfinimento. Analizzato anche il livello di acido lattico prodotto nell'esecuzione del test. Analisi del microbiota intestinale sono state svolte in 4 momenti: 21 e 2 settimane pre-gara, 2 h e 10 giorni post-gara) attraverso il sequenziamento dei campioni di feci raccolti.

Intervento: Preparazione e partecipazione alla WSER (*Western States Endurance Run*), una gara di 163 km attraverso le montagne con una salita di 5,486 m ed un dislivello di 7,010 m. Per le 6 settimane precedenti l'inizio del programma di allenamento specifico per la gara, l'atleta ha corso una media di 115 km alla settimana, su di un terreno pari, con un leggero allenamento di forza svolto in parallelo. Il programma ha avuto inizio 21 settimane prima della WSER, l'atleta ha quindi aumentato a 124 km il totale percorso con un passo di 201 m/min e aggiunto 120 min di allenamento specifico per forza e allungamento, accumulando un totale di 15,331 minuti totali. Inoltre, per prepararsi ha svolto due gare rispettivamente di 50 e 100km. Dopo la WSER, l'atleta ha aspettato una settimana prima di svolgere brevi allenamenti (30-60 min) di corsa leggera.

Risultati: La diversità è oscillata durante lo studio, diminuendo dopo 19 settimane di programma di preparazione alla gara ed è aumentata dopo l'evento. Il rapporto tra Firmicutes/Bacteroides, un macroindicatore della composizione del microbiota, è risultato relativamente stabile nel pre-gara, arrivando però quasi a triplicare 2 h dopo la WSER, data la diminuzione quasi del 69% dei Bacteroides. Anche la quantità relativa di Proteobacteria è aumentata più di 5 volte nel post-gara, ciò è dovuto principalmente ad un aumento di più di 29 volte del numero di Haemophilus. Altri cambiamenti degni di nota sono dovuti alla proliferazione di Veillonella (+14,229%) e Streptococcus (+438%) ed una diminuzione di Alloprevotella (-79%) e Subdoligranulum (-50%).

Discussione: Manipolare l'ecosistema microbico ha implicazioni sulla salute ed un potenziale terapeutico nell'uomo. Questo studio ha dimostrato il più rapido e consistente cambiamento nel microbiota dopo l'intervento di esercizio fisico ad alta intensità, nella letteratura prodotta sull'uomo fino a questo momento. Queste dinamiche riguardanti i microbioti intestinali, evidenziano ancora una volta l'importanza dell'attività fisica sulla salute. Ricchezza nella tassonomia (Alpha diversità) è spesso considerata un indicatore di un microbiota sano. Paradossalmente, in questo caso, è

diminuita dopo aver svolto 19 settimane di allenamento in preparazione alla gara. Questo può essere dovuto alla proliferazione di specie batteriche vantaggiose, come quelle coinvolte nella produzione di butirrato (es: *Faecalibacterium*, +40% da inizio studio a pre-gara), con il concomitante decremento di microrganismi meno rilevanti. Dei cambiamenti avvenuti post-gara, un aumento di ben 143 volte nella quantità di *Veillonella* è stato il più significativo. Recenti studi hanno indicato la *Veillonella* un ruolo nel ciclo dell'acido lattico. Sono state osservate anche altre dinamiche post-gara, con l'insorgenza di *Haemophilus*, un genere di batteri con varie specie patogene e di *Streptococcus*. E' possibile che la proliferazioni di patogeni intestinali giochi un ruolo nell'incidenza di infezioni in atleti, dopo un prolungato esercizio fisico. In questo caso però, non si sono riportate problematiche di infezione o infiammazione a livello gastrointestinale, durante e post-gara.

Conclusione: In conclusione, questi dati aggiungono ad una letteratura in crescita, evidenze che l'intenso esercizio fisico possa modificare la composizione del microflora intestinale. Anche se altri fattori (dieta, viaggi...) possono avere influenzato questi risultati, nessuna modifica nella dieta o nel tono dell'umore sono stati segnalati nel corso della raccolta dati. In ogni caso, più studi con programmi di allenamento pianificati, in popolazioni sane e patologiche, con un'equipe interdisciplinare, devono essere condotti per comprendere al meglio l'interazione tra attività fisica e microbiota intestinale.

### **3.3 Tabelle sinottiche:**

Nelle pagine seguenti vengono presentate le tabelle sinottiche degli studi selezionati

STUDIO	METODI DI RICERCA	VALUTAZIONE	RISULTATI	CONCLUSIONE
<p>Emiko Morita et Al. (2018)(48)</p> <p><i>'Aerobic Exercise Training with Brisk Walking Increases Intestinal Bacteroides in Healthy Elderly Women'</i></p> <p><i>Clinical trial</i></p> <p><u>Obiettivo:</u> Esaminare gli effetti dell'intervento dell'attività fisica nella composizione del microbiota intestinale in donne anziane in salute.</p>	<p>32 donne sedentarie ed in salute con età, di età 65 anni o maggiore. Le partecipanti hanno scelto volontariamente a quale programma di esercizi sottoporsi: esercizio aerobico (camminata veloce) (AE) o esercizi per il tronco (TM, controllo), della durata complessiva di 12 settimane. Campioni delle feci (per valutare la diversità microbica), composizione corporea, abilità motoria, analisi cliniche e questionari su: attività fisica, dieta e modalità di evacuazione campioni delle feci sono stati raccolti prima dell'inizio del programma. Queste misure sono state poi valutate nuovamente entro una settimana dalla conclusione dell'intervento.</p>	<p>La qualità metodologica dello studio è stata valutata tramite la PEDro scale e risulta un punteggio di 5/10.</p>	<p><u>Diversità microbica:</u></p> <p>La quantità relativa dei Bacteroides è aumentata in maniera significativa, mentre quella del Clostridium subcluster XIVa è diminuita, nel gruppo AE. La quantità relativa del Clostridium cluster IX è invece aumentata solo nel gruppo TM. Le altre specie microbiche sono rimaste invariate. Il Gruppo AE è stato diviso in due, a seconda se i partecipanti abbiano o meno aumentato il tempo dell'allenamento di circa 20 minuti (come suggerito dall'istruttore), la <math>\Delta</math>%Bacteroides è maggiore in chi lo ha fatto.</p> <p><u>Outcome secondari:</u></p> <p>Il numero di passi, come il tempo speso camminando veloce e l'energia spesa per l'allenamento (EE), sono aumentate in maniera significativa nel gruppo AE solamente. Il valore del K-W test e del 6MWD sono aumentati in maniera simile in entrambi i gruppi.</p>	<p>Svolgere camminata veloce come esercizio aerobico, ponendosi l'obiettivo di aumentare il tempo dell'allenamento, può incrementare il numero di Bacteroides, oltre che migliorare il fitness cardiorespiratorio in donne anziane in salute</p>

STUDIO	METODI DI RICERCA	VALUTAZIONE	RISULTATI	CONCLUSIONE
<p>Hirokazu Taniguchi et al,(2018)(49)</p> <p><i>'Effects of short-term endurance exercise on gut microbiota in elderly men'</i></p> <p>RCT</p> <p><u>Obiettivo</u>: valutare se esercizi di resistenza possono modulare il Microbiota intestinale nei soggetti anziani, e se questi cambiamenti sono associati con fenotipi cardiometabolici.</p>	<p>33 uomini anziani giapponesi (62-76 anni) in salute. I partecipanti sono stati sottoposti ad un programma di esercizi aerobici di 5 settimane sotto supervisione. Gli esercizi comprendevano 3 allenamenti col cicloergometro a settimana. Il livello del fitness cardiorespiratorio è stato valutato tramite la misurazione del picco di VO2.</p> <p>Eseguite analisi del sangue ricercando i valori di AST, ALT, c-GTP, e della contrazione di trigliceridi, emoglobina glicata, glicemia e insulina a digiuno. Anche pressione brachiale sistolica e diastolica sono state monitorate.</p> <p>Campioni delle feci sono stati raccolti ad inizio e fine intervento (5 settimane), come a 5 settimane dalla conclusione del programma, e sono state sottoposte a sequenziamento di 16 rRNA, per valutare la diversità microbica.</p>	<p>La qualità metodologica dello studio è stata valutata tramite la PEDro scale e risulta un punteggio di 7/10.</p>	<p>Nessuna delle variazioni degli indici di diversità Alpha e Beta è stata trovata tra l'esercizio e i periodi di controllo. Si è verificato un aumento di Oscillospira da non considerare significativo, anche se si è evidenziata una correlazione positiva tra la quantità di questo microbiota e cambiamenti nel livello di HDL e negativa con quello di HbA1c e della percentuale di grasso corporeo. Mentre è risultata significativa la diminuzione del Clostridium difficile, associato positivamente con cambiamenti in SBP, CAVI, AST, ALT e HbA1c, e negativamente con cambiamenti nel picco di VO2, colesterolo totale e LDL Infine cambiamenti in Alpha diversità sono stati correlati negativamente con la pressione brachiale sistolica e diastolica.</p>	<p>I risultati rivelano, che un programma di esercizio fisico di breve durata non influenza in maniera apprezzabile la diversità e la composizione microbica, anche se piccoli cambiamenti sono stati associati alla diminuzione di fattori di rischio cardiometabolici.</p>

STUDIO	METODI DI RICERCA	VALUTAZIONE	RISULTATI	CONCLUSIONE
<p>David M. Keohanea et al, (2019)(50)</p> <p><i>'Four men in a boat: Ultra-endurance exercise alters the gut microbiome'</i></p> <p>Case report</p> <p><u>Obiettivo:</u> Esplorare gli effetti di un prolungato ed intenso esercizio fisico sul microbioma intestinale di 4 atleti ben allenati, che hanno completato senza aiuti una traversata transatlantica</p>	<p>Campioni di feci sono stati raccolti in 4 atleti per essere sequenziate in modo da valutare la comunità microbica, rispettivamente prima, a metà, alla conclusione e a 3 mesi di distanza da una gara di canottaggio transatlantica. La durata totale dell'evento è stato di 33 giorni per 5000 km di percorso. La dieta e i valori nutrizionali sono stati registrati attraverso un questionario validato. Inoltre misurati valori antropometrici e di fitness cardiorespiratorio (VO2).</p>	<p>Non valutata, scelta presa rispettando i criteri della PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR)</p>	<p>Crescita nell'Alpha diversità si è osservata in tutti gli atleti. Dorea longicatena, Roseburia hominis and membri non classificati del genere Subdoligranulum sono aumentati in tutti e 4 gli atleti, mentre Bacteroides finegoldii è risultato essere diminuito. Il secondo atleta ha registrato un notevole aumento nella quantità di Prevotella. La diversità è stata evidenziata a partire dal 17esimo giorno. La diversità acquisita si è mantenuta, almeno parzialmente in 2 atleti a distanza di 3 mesi della traversata. Si evidenzia una sovrabbondanza nella rappresentazione di vie metaboliche per la produzione di amino acidi, alcune specifiche catene di media e lunga grandezza di acidi grassi e per la sintesi di S-adenil metionina. Il livello di fitness aerobico VO2 è non è variato in maniera significativa.</p>	<p>E' stato dimostrato che l'esercizio ad alta intensità incrementa la diversità microbica, la proliferazione di specie che producono butirato ed influenza in positivo il potenziale metabolico di alcuni geni con funzionalità specifiche in atleti ben allenati.</p>

STUDIO	METODI DI RICERCA	VALUTAZIONE	RISULTATI	CONCLUSIONE
<p>Gregory J. Grosicki et al, (2019)(51)</p> <p><i>'Rapid gut microbiome changes in a world-class ultramarathon runner'</i></p> <p>Case report</p> <p><u>Obiettivo:</u> esplorare gli effetti di intensa attività fisica sul microbiota intestinale</p>	<p>Valutati i cambiamenti nella diversità microbica in un ultramaratoneta prima e dopo aver partecipato alla Western States Endurance Run (WSER), una maratona di 163 km tra le montagne. Prelevate misure antropometriche e della composizione corporea oltre che quella di VO2 massimale e submassimale. Campioni di feci prelevate: 21 e 2 settimane pre-gara e 2h e 10 giorni post, per essere poi sequenziate.</p>	<p>Non valutata, scelta presa rispettando i criteri della PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR)</p>	<p>A distanza di 2 h dopo la WSER, Il rapporto tra Firmicutes/Bacteroides, un macroindicatore della composizione del microbioma è quasi triplicato, data la diminuzione quasi del 69% dei Bacteroides. Anche la quantità relativa di Proteobacteria è aumentata più di 5 volte nel post-gara, ciò è dovuto principalmente ad un aumento di più di 29 volte del numero di Haemophilus. Altri cambiamenti degli di nota sono dovuti alla proliferazione di Veillonella (+14,229%) e Streptococcus (+438%) ed una diminuzione di Alloprevotella (-79%) e Subdoligranulum (-50%).</p>	<p>In conclusione, questi dati aggiungono ad una letteratura in crescita, evidenze che l'intenso esercizio fisico possa modificare la composizione del microbioma intestinale</p>

## CAPITOLO 4: DISCUSSIONE

L'argomento di questa revisione risulta più che mai attuale, lo studio del microbiota, soprattutto per quanto concerne l'uomo, si è delineato negli ultimi anni, come una nuova frontiera nel campo della prevenzione e in generale della salute. Gli effetti benefici e le funzioni svolte dal microbiota intestinale sono stati sempre più al centro dell'interesse medico e farmaceutico. E' ormai risaputo che dieta ed antibiotici sono in grado di modificare la microflora dell'essere umano, seppure anche in questi frangenti ci sia bisogno di una maggiore e più approfondita ricerca riguardo le modalità e le tempistiche. E' invece, quasi inesplorato, per quanto riguarda l'uomo, il rapporto tra attività fisica e la comunità microbica intestinale. In questo studio si è cercato di dimostrare se e come l'esercizio fisico fosse in grado di alterare la composizione del microbiota. Quindi l'unico *outcome* preso in considerazione è stata l'alterazione del microbiota sia per quanto riguarda la diversità che la composizione.

Gli articoli in esame propongono esercizi fisici molto diversificati tra loro, sia per le tempistiche, sia per quanto riguarda la tipologia dell'intervento stesso. In generale però, l'esercizio fisico ha portato cambiamenti nella comunità microbica. Solo in uno studio (49), le alterazioni non sono state considerate significative. Questo può essere dovuto sia alla breve durata del programma d'intervento, sia alla ridotta intensità dell'attività fisica in sé. Per confrontare l'effetto che queste variabili hanno sul microbiota, si possono citare gli studi di Hirokazu Taniguchi et al, (48) e di Emiko Morita et al (49). La popolazione, infatti, può essere paragonata per l'età e numero di partecipanti: una 30ina di anziani, giapponesi ed in salute. La differenza sostanziale è rappresentata dal sesso dei due campioni, nel primo sono state selezionate solo donne e nel secondo solo uomini. Il contributo che il tipo di sesso ha nella diversità microbica è ancora da stabilire con certezza, sono presenti pochi studi a riguardo e i risultati delle evidenze indicano che le differenze, se presenti, siano difficili da analizzare, dato anche il grande numero di cofattori che possono influenzare questa misura. (52) In ogni caso, questo elemento può essere considerato trascurabile dato che l'obiettivo di questo studio è valutare l'effetto che l'esercizio ha sull'adulto in generale. Confrontando quindi tempistica ed intensità del programma di esercizio: nello studio di Hirokazu Taniguchi et al, la durata dell'intervento è di sole 5 settimane, con un'attività fisica che viene svolta per sole 3 volte alla settimana, arrivando ad un massimo di 45 minuti a seduta (cicloergometro). Nel secondo studio, dalla durata di 12 settimane,

viene invece valutato il ruolo della camminata veloce; in questo caso l'attività viene svolta quotidianamente per la durata di un'ora e come risultato si ha l'aumento della quantità relativa di microbioti. Da notare che l'aumento si è notato maggiormente in chi ha aggiunto ulteriori 20 minuti di camminata al proprio allenamento di base, come suggerito ed indicato dagli istruttori. Questi risultati portano a pensare che durata ed intensità giochino un ruolo chiave nel cambiamento della composizione microbionica.

Ad aggiungere ulteriori prove a questa ipotesi, le informazioni provenienti dai *case report*, in cui sportivi già ben allenati, svolgono gare ad alta intensità rispettivamente di breve (51) e lunga durata (50), evidenziando grandi mutamenti nella composizione microbionica. Da notare che altri studi hanno già dimostrato la maggiore diversità nel microbiota dell'atleta rispetto ad un individuo sedentario. Più precisamente gli atleti, oltre ad avere un microbiota maggiormente diversificato, mostrano un incremento nelle vie metaboliche per la produzione di aminoacidi e per il metabolismo dei carboidrati, come un aumento nella conta dei metaboliti fecali (principalmente SCFA, quali acetato propionato e butirato), rispetto al gruppo di controllo sedentario. (53)

In questi *report* però è la grande intensità del tipo di intervento che contraddistingue l'acquisizione di microflora maggiormente diversificata. Nel primo si valuta l'effetto di un'ultramaratona di 163 km, mentre nel secondo una traversata di transoceanica di 27 giorni; in entrambi i casi si ha un grande cambiamento nell'Alpha diversità (diversità nella ricchezza tassonomica). Interessante notare come nel primo *report* si riduca, dopo circa 19 settimane di allenamento, in preparazione alla gara, la diversità del microbiota, evidenziando forse una selezione delle specie più vantaggiose ed una conseguenziale diminuzione di quelle meno adatte e/o rilevanti. Mentre a conclusione della gara, dove l'esercizio e lo sforzo fisico sono stati sicuramente di grande intensità, si denota un rapido e significativo aumento della diversità. Mentre nel secondo articolo, richiamano all'interesse, le tempistiche con cui si manifestano le prime alterazioni e la loro notevole durata; più precisamente i primi cambiamenti si mostrano dal 17esimo giorno e perdurano fino a fine gara, per poi mantenersi, parzialmente, fino a 3 mesi di distanza dalla conclusione della traversata in due dei quattro atleti.

Le specie microbioniche che hanno subito alterazioni negli articoli esaminati sono diverse ed eterogenee. Nel primo studio l'incremento interessa principalmente il genere *Bacteroides*, mentre si nota una diminuzione nel *Clostridium* subcluster XIVa.

Nel secondo, si evidenzia un aumento non significativo nell'Oscillospira, e una diminuzione del Clostridium difficile. Durante la traversata invece sono i microbioti Dorea longicatena, Roseburia hominis e del genere Subdoligranulum ad essere incrementati, mentre è il Bacteroides finegoldii a diminuire. Infine, nell'ultimo report, sono aumentati i livelli di Proteobacteria, veillonella e Streptococcus e diminuiti quelli di di Alloprevotella e Subdoligranulum. Di queste specie è noto il ruolo ambivalente del genere Bacteroides che varia per l'ospitante, tra positivo e negativo, a seconda dell'ambiente intestinale in cui si trova. Per esempio, può avere un'azione protettiva rispetto alla sindrome del colon irritabile, come può promuovere la suscettibilità a patologie allergiche croniche. La sua presenza in ridotte quantità di questo microbiota è però associata ad obesità e sindromi metaboliche. L'Oscillospira, invece, è stata correlata positivamente con un metabolismo magro ed è stata dimostrata una sua diminuzione nella sua quantità relativa in individui affetti dal morbo di Crohn e da statoepatite non alcolica. I risultati indicano che l'Oscillospira ha un ruolo benefico sulla salute dell'ospite, nello specifico potrebbe essere collegata alla salute cardiometabolica. Per quanto riguarda il Clostridium difficile, che è la maggior causa di diarrea di origine infettiva nell'uomo, i risultati indicano che l'esercizio fisico è in grado di diminuire la produzione di tossine di questo batterio. Inoltre, la diminuzione di questo microbiota è stata associata ad un aumento nel picco di VO<sub>2</sub> e un decremento nel CAVI e nella NbA1c durante l'intervento. Nel terzo report le specie batteriche maggiormente incrementate sono Roseburia hominis e membri del genere Subdoligranulum, entrambi produttori di butirrato. Quest'ultimo è un SCFA, che gioca un ruolo importante nella regolazione dell'intestino, riducendo infiammazione, stress ossidativo, oltre che rinforzare la barriera epiteliale e moderare la sensibilità viscerale. E' incrementata anche la Dorea longicatena, capace di migliorare il metabolismo intestinale, oltre che essere correlata positivamente con la sensibilità dell'insulina. Anche nell'ultimo studio, generi produttori di butirrato, come il Faecalibacterium, sono incrementati maggiormente. Inoltre anche la Veillonella, aumentata di ben 143 volte, è stato dimostrato essere coinvolta nel ciclo dell'acido lattico. Tutti questi risultati mostrano che seppure in maniera molto eterogenea, l'attività fisica ha influenzato l'acquisizione di un microbiota amico, per di più diminuendo, in alcuni casi (Clostridium), il livello di batteri patogeni. Interessante notare come nelle attività fisica di grande intensità, siano incrementate specie in grado migliorare la performance degli atleti.

Con quali modalità quindi l'esercizio fisico è in grado di alterare la comunità microbionica? Molti studi indicano la presenza di un'interazione bidirezionale tra viscere e apparato muscolare, definita asse muscolo-viscerale. L'esistenza di questa asse è basata sull'evidenza che le contrazioni dell'apparato muscolare abbiano effetti antiinfiammatori, per mezzo del rilascio di miochine. Le suddette sembrano giocare un ruolo importante nella mediazione della secrezione del peptide-1 simile al glucagone (GLP-1, incretina chiave coinvolta nel metabolismo in tutto il corpo) durante l'esercizio fisico. Ad esempio, l'interleuchina-6 è coinvolta nella secrezione di GLP-1 da parte delle cellule-L nell'ileo. Altre evidenze dell'esistenza dell'asse, sussistono dalla produzione da parte dei microbioti di SCFA, mediatori di energia metabolica nei mitocondri delle cellule muscolari, che in parte aiutano a regolare il metabolismo del glucosio. Inoltre, gli SCFA interagiscono con i recettori specifici delle proteine G (GPR41 e GPR43) nelle cellule-L intestinali, stimolando la secrezione di GLP-1. Diversi batteri producono SCFA, i più noti sono: Bifidobacterium (phylum Actinobacteria) che produce acetato il quale può essere trasformato in butirrato, Akkermansia (phylum Verrucomicrobia) che produce propionato il quale può essere trasformato invece in acetato. Acetato e butirrato incrementano entrambi l'ossidazione del grasso muscolare, mutando lo stato ossidativo delle fibre muscolari. Quindi l'acetato e il butirrato influenzano la flessibilità metabolica, aumentando la capacità di utilizzare lipidi o carboidrati come riserva energetica. Il butirrato, inoltre, inibisce l'istone deacetilasi, proteggendo le proteine muscolari dal catabolismo e quindi prevenendo la perdita di massa muscolare dovuta all'età. Inoltre, è stato documentato che l'esercizio fisico renda gli SCFA maggiormente reperibili alla comunità batterica. (54) Queste testimonianze, oltre che quelle raccolte negli studi selezionati, portano a pensare che un'asse che collega muscoli e intestino, in effetti, esista e che sia manovrata in parte dal microbiota intestinale. Le modalità esatte con cui, però, questo avvenga è ancora da stabilire.

#### **4.1 Limiti**

Alla luce dei risultati e della discussione derivata dall'analisi degli studi selezionati, è necessario definire i limiti della revisione di questa tesi. La prima difficoltà è stata individuare studi scientifici con campioni numerosi e omogenei, quindi confrontabili tra loro. Nello specifico, volendo valutare l'effetto dell'attività fisica, sono stati eliminati gli studi dove i partecipanti non fossero in salute, fosse stata considerata la

dieta come intervento o fossero stati utilizzati probiotici. Con questi criteri di esclusione sono stati selezionati solo quattro articoli dalle principali banche dati: Pubmed, Cochrane e PEDro. La popolazione selezionata risulta però molto eterogenea e difficilmente comparabile, in quanto l'età è un fattore riconosciuto in grado di alterare di per sé il microbiota, soprattutto durante la senilità. Inoltre anche il sesso, le cui evidenze nel modificare la comunità microbica devono essere approfondite, può avere influenzato i risultati. Il totale di partecipanti, considerando tutti gli studi ed escludendo 5 soggetti ritirati, è solamente di 65. Un'altra limitazione è rappresentata dalla dieta, seppure tutti gli studi selezionati monitorino in qualche modo questa variabile, non vi è la certezza assoluta che essa non abbia influenzato, anche parzialmente, i risultati. Inoltre, la tipologia di intervento è diversa in ogni studio, sia per tempo, che intensità, che modalità. Seppure in alcuni studi siano comuni alcuni canoni di misurazione di essa, come il  $V_{O2}$ , un confronto oggettivo tra essi risulta molto difficoltoso. La mancanza di *follow-up* a distanza limita la scoperta di possibili alterazioni a lungo termine e non permette di valutare la durata dell'effetto dell'attività fisica sul microbiota acquisito. Infine la qualità degli studi selezionati, di cui due volontariamente non valutati, richiama alla cautela nell'interpretazioni dei dati, in quanto non è possibile escludere *bias*. Quest'ultima considerazione, è da considerare più come una precisazione, in quanto la *scoping review* non richiede la valutazione degli articoli selezionati.

## **CAPITOLO 5: CONCLUSIONE**

In questa revisione si è posto l'obiettivo di indagare la letteratura a supporto dell'efficacia dell'attività fisica come fattore in grado di alterare la composizione del microbiota intestinale nell'adulto sano. I risultati fanno supporre che l'esercizio fisico potrebbe possa avere effetti sulla composizione del microbiota. In particolare, le variabili di intensità e durata potrebbero essere la chiave per una modificazione significativa. Inoltre, di buon auspicio, è anche l'acquisizione di un microbiota 'amico' con un impatto positivo sulla salute dei partecipanti.

### **5.1 Implicazione per la ricerca**

Nonostante il cambiamento sopraccitato sia incoraggiante non si può stabilire con certezza che l'attività fisica sia stata l'unica ad avere influenzato il microbiota, dato il

grande numero di cofattori esistenti. Per risolvere questa dinamica si suggeriscono elementi che possono essere utili per sviluppi di futuri *trial*.

Dimensione del campione: la scarsità di partecipanti selezionati in ogni studio può portare ad imprecisioni nella valutazione dei risultati ottenuti e nella loro significatività.

Caratteristiche dei partecipanti: i criteri di esclusione selezionati risultano nella scelta di una popolazione ancora troppo eterogenea. Sarebbe importante valutare con precisione il ruolo dell'attività fisica in soggetti con caratteristiche più specifiche, considerando quindi ad esempio campioni di solo atleti, di solo anziani, di solo sedentari e via dicendo. Inoltre sarebbe interessante approfondire il ruolo che il sesso ha sul microbiota. In modo da poter essere il più oggettivi possibile nel confrontare studi con partecipanti più omogenei, scoprendo così l'effetto preciso su questi campioni, evitando dispersione ed imprecisioni.

Tipologia di trattamento: risulta necessario definire con maggiore precisione il tipo di intervento che si vuole somministrare, la durata e l'intensità. Ciò per poter comprendere al meglio quale elemento sia determinante per un miglioramento. Sarebbe inoltre utile uniformare le scale o i questionari scelti per valutare l'attività fisica, in modo da poter confrontare in maniera oggettiva anche studi con interventi differenti.

Durata degli studi: Oltre che la durata dell'intervento stesso, sarebbe doveroso controllare gli effetti che questo ha portato anche a lungo termine, verificando quindi con *follow-up* anche a distanza di mesi.

Scelta degli outcome: Servirebbe approfondire ed uniformare le modalità del sequenziamento svolto nei campioni di feci, così da poter valutare anche la diversificazione di specie minori ed avere la possibilità di confrontare con più facilità ed efficienza i risultati.

Randomizzazione: in modo da escludere ulteriori *bias*.

Con le modalità proposte, futuri studi potrebbero dare luce a nuove scoperte nel campo microbiotico e chiarire il ruolo dell'esercizio fisico nella sua alterazione.

## **5.2 Implicazioni per la pratica**

I risultati di questo studio pongono l'attività fisica come un fattore in grado di modificare sul microbiota intestinale, anche se non possibile affermarlo con certezza dati i limiti sopracitati. Nel caso eventuali nuove evidenze confermino questa ipotesi, l'esecuzione di una precisa modalità di esercizio potrebbe rivelarsi in grado di sviluppare un microbiota capace, ad esempio, di prevenire alcune patologie in soggetti anziani o migliorare le performance di atleti e sportivi.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. *Gut microbiota in health and disease*. *Physiol. Rep.* 2010; 90(3):859-904.
2. Guamer F, Malagelada JR. *Gut flora in health and disease*. *The Lancet* 2003; 361(9356):512-9
3. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 13780-13785
4. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota*. *Nature* 2012; 489(7415):220–230.
5. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR et al. *Enterotypes of the human gut microbiome*. *Nature* 2011; 473(7346):174–180.
6. Knights D, Ward TL, McKinlay CE, Miller H, Gonzalez A, McDonald D et al. *Rethinking “enterotypes”*. *Cell Host Microbe* 2014; 16(4):433–437
7. Shapira, M. *Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis*. *Trends in Ecology & Evolution* 2016; 31(7): 539–549.
8. Zhang, Y., Wang, X., Li, H., Ni, C., Du, Z., & Yan, F. *Human oral microbiota and its modulation for oral health*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; 99:883–893.
9. Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T., & Nakatsu, C. H. *Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract*. *Microbes and Environments* 2017; 32(4): 300–313.

10. Alarcón, T., Llorca, L., & Perez-Perez, G. *Impact of the Microbiota and Gastric Disease Development by Helicobacter pylori*. *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter Pylori* 2017; 400:253-275
11. Nardone, G., & Compare, D. *The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases?* *United European Gastroenterology Journal* 2015; 3(3): 255–260.
12. El Aidy, S., van den Bogert, B., & Kleerebezem, M. *The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health*. *Current Opinion in Biotechnology* 2015; 32: 14–20.
13. Hollister, E. B., Gao, C., & Versalovic, J. *Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health*. *Gastroenterology* 2014, 146(6): 1449–1458.
14. Maynard, C., & Weinkove, D. *The Gut Microbiota and Ageing*. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science* (2018); 90:351-371.
15. Maria G, Dominguez-Bello, Elizabeth K Costello, Monica Contreras, Magda Magris, Glida Hidalgo, Noah Fierer, Rob Knight. *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(26):11971-5
16. Ouwehand A, Isolauri E, Salminen S. *The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood*. *Eur J Nutr* 2002; 41 Suppl 1: I32-I37
17. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. *Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants*. *Pediatrics* 1983; 72: 317-321

18. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, Brown D, Stares MD, Scott P, Bergerat A, Louis P, McIntosh F, Johnstone AM, Lobley GE, Parkhill J, Flint HJ. *Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota*. ISME J 2011; 5: 220-230
19. Li, D., Wang, P., Wang, P., Hu, X., & Chen, F. *Targeting the gut microbiota by dietary nutrients: A new avenue for human health*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2019; 59(2):181-195.
20. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 14691-14696
21. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. *An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease*. Nature 2007; 449: 811-818
22. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, Naidu N, Choudhury B, Weimer BC, Monack DM, Sonnenburg JL. *Microbiota-liberated host sugars facilitate postantibiotic expansion of enteric pathogens*. Nature 2013; 502: 96-99
23. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. *Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota*. ISME J 2007; 1: 56-66
24. Panda S, El khader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A, Cuenca S, Guarner F, Manichanh C. *Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota*. PLoS One 2014; 9: e95476

25. Sartor RB. *Microbial influences in inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology 2008; 134: 577-594
26. Magwira CA, Kullin B, Lewandowski S, Rodgers A, Reid SJ, Abratt VR. *Diversity of faecal oxalate-degrading bacteria in black and white South African study groups: insights into understanding the rarity of urolithiasis in the black group*. J Appl Microbiol 2012; 113: 418-428
27. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. Science 2001; 291: 881-884
28. Thomas CM, Hong T, van Pijkeren JP, Hemarajata P, Trinh DV, Hu W, Britton RA, Kalkum M, Versalovic J. *Histamine derived from probiotic Lactobacillus reuteri suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling*. PLoS One 2012; 7: e31951
29. Fukiya S, Arata M, Kawashima H, Yoshida D, Kaneko M, Minamida K, Watanabe J, Ogura Y, Uchida K, Itoh K, Wada M, Ito S, Yokota A. *Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by Bacteroides intestinalis AM-1 isolated from human feces*. FEMS Microbiol Lett 2009; 293: 263-270
30. Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. *Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties*. Biomed Res Int 2015; 2015: 905215
31. Pierro A, van Saene HK, Donnell SC, J Hughes, C Ewan, A J Nunn, D. A. Lloyd. *Microbial Translocation in neonates and infants receiving longterm parenteral nutrition*. Arch Surg 1996; 131:176-179.
32. Wallace BD, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, Venkatesh M, Jobin C, Yeh LA, Mani S, Redinbo MR. *Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme*. Science 2010; 330: 831-835

33. Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions*. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108 Suppl 1: 4659-4665
34. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. *Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa*. Semin Immunol 2007; 19: 70-83
35. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. *Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity*. Nat Immunol 2003; 4: 269-273
36. He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, Knowles DM, Rescigno M, Cerutti A. *Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine*. Immunity 2007; 26: 812-826
37. Kamada N, Nunez G. *Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria*. Gastroenterology. 2014 May; 146(6):1477–1488.
38. Saitoh Y, Suzuki H, Tani K, Nishikawa K, Irie K, Ogura Y, Atsushi Tamura, Sachiko Tsukita, Yoshinori Fujiyoshi. *Structural insight into tight junction disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin*. Science 2015; 347(6223):775–778
39. Lutgendorff F, Akkermans LM, Söderholm JD. *The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage*. Curr Mol Med 2008; 8: 282-298
40. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. *Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function*. Gastroenterology 2007; 132: 1359-1374

41. Alam M, Midtvedt T, Uribe A. *Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats*. Scand J Gastroenterol 1994; 29: 445-451
42. Banasaz M, Norin E, Holma R, Midtvedt T. *Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with Lactobacillus rhamnosus GG*. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 3031-3034
43. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. *The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems*. Ann Gastroenterol 2015; 28(2):203
44. Labus JS, Hollister EB, Jacobs J, Kirbach K, Oezguen N, Gupta A et al. *Differences in gut microbial composition correlate with regional brain volumes in irritable bowel syndrome*. Microbiome 2017; 5(1):49.
45. Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, Nardelli A, Bolino C, Lau JT et al. *Probiotic Bifidobacterium longum NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome*. Gastroenterology 2017; 153:448–459
46. Hemarajata P, Versalovic J. *Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation*. Therap. Adv. Gastroenterol. 2013; 6: 39-51
47. Binns N. *Probiotics, Prebiotics and the gut microbiota. Health effects of Prebiotics and Probiotics*. Intestinal Life Science Institute 2013; 16-20
48. Morita, Yokoyama, Imai, Takeda, Ota, Kawai, Okazaki. *Aerobic Exercise Training with Brisk Walking Increases Intestinal Bacteroides in Healthy Elderly Women*. Nutrients 2019; 11(4):868.
49. Taniguchi, H., Tanisawa, K., Sun, X., Kubo, T., Hoshino, Y., Hosokawa, M, Higuchi, M. *Effects of short-term endurance exercise on gut microbiota in elderly*

men. *Physiological Reports* 2018; 6(23):e13935

50. Keohane, D. M., Woods, T., O'Connor, P., Underwood, S., Cronin, O., Whiston, R., Molloy, M. G. *Four men in a boat: Ultra-endurance exercise alters the gut microbiome.* *Journal of Science and Medicine in Sport* 2019; 22(9):1059-1064
51. Grosicki, G. J., Durk, R. P., & Bagley, J. R. *Rapid gut microbiome changes in a world-class ultramarathon runner.* *Physiological Reports* 2019; 7(24):e14313.
52. Kim YS, Unno T, Kim BY, Park MS. *Sex Differences in Gut Microbiota.* *World J Mens Health.* 2020 Jan; 38(1):48-60.
53. Barton, W., Penney, N. C., Cronin, O., Garcia-Perez, I., Molloy, M. G., Holmes, E. O'Sullivan, O. (2017). *The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level.* *Gut, gutjnl* 2016; 67(4):625-633.
54. Ortiz-Alvarez, L., Xu, H., & Martinez-Tellez, B. *Influence of Exercise on the Human Gut Microbiota of Healthy Adults.* *Clinical and Translational Gastroenterology* 2020; 11(2): e00126.