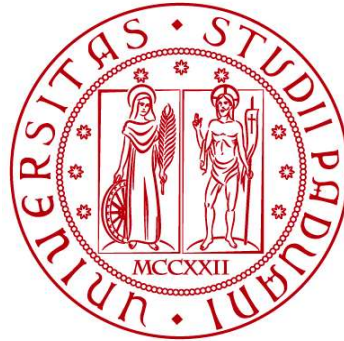


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**CONSIDERAZIONI SUGLI EFFETTI
CAUSATI DAL DISALLINEAMENTO
CIRCADIANO SUL MICROBIOTA ORALE**

Tutor: Prof.ssa Gabriella Margherita Mazzotta
Dipartimento di Biologia

Laureando: Lorenzo Pazzi

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE E ABSTRACT DELL'ARTICOLO

2. STATO DELL'ARTE

2.1. Introduzione al ritmo circadiano

2.1.1. Orologio circadiano

2.1.2. Alterazione dell'orologio circadiano

2.2. Microbiota

2.2.1. Introduzione al microbiota

2.2.2. Microbiota orale ed intestinale: analogie e differenze

2.2.3. Composizione del microbiota orale

3. APPROCCIO SPERIMENTALE

3.1. Descrizione dell'esperimento

3.2. Tecniche di biologia molecolare

3.2.1. Prelievo di saliva

3.2.2. Quantificazione dell'estratto

3.2.3. PCR pair-end della regione V4 del rRNA

3.2.4. Purificazione della libreria

3.2.5. Sequenziamento Illumina e ri-sequenziamento

3.2.6. Analisi bioinformatiche

3.2.7. Analisi statistiche

4. RISULTATI DELL'ESPERIMENTO

4.1. Il microbiota orale mostra una ritmicità circadiana endogena

4.2. Il disallineamento circadiano fa variare l'abbondanza relativa e il ritmo circadiano del microbiota

4.3. Il disallineamento circadiano impatta i pathways funzionali associati alla composizione della comunità microbica

5. DISCUSSIONE

5.1. Ritmicità del microbioma e possibili cause

5.2. Numerosità del campione

5.3. Rapporto tra microbiota e alimentazione

5.4. Medicina personalizzata

6. BIBLIOGRAFIA

1 INTRODUZIONE E ABSTRACT DELL'ARTICOLO

Nell'elaborato di tesi, viene presentato e discusso un lavoro di Chellappa et al. dal titolo "Proof-of-principle demonstration of endogenous circadian system and circadian misalignment effects on human oral microbiota", pubblicato nel 2021 sul FASEB JOURNAL.

Nel lavoro, gli autori esaminano come il disallineamento circadiano, ovvero il disallineamento tra l'orologio circadiano centrale ed i cicli ambientali e comportamentali, nell'uomo possa provocare effetti negativi sull'apparato cardio-vascolare e sul metabolismo.

Per spiegare tali effetti, ipotizzano che tale disallineamento provochi una alterazione del microbiota oro-gastrointestinale. Rimane tuttavia ignoto, se il microbiota orale abbia dei ritmi circadiani endogeni (indipendenti da fattori esterni) e se un eventuale disallineamento dell'orologio circadiano possa alterare la composizione delle comunità dei microrganismi che abitano il cavo orale.

Lo studio, sebbene sia riferito ad un esperimento di breve durata, ha reso evidente come l'abbondanza relativa delle diverse specie di microrganismi sia caratterizzata da un rilevante ritmo circadiano.

Il disallineamento forzato, indotto dal protocollo di laboratorio, ha alterato le originarie proporzioni tra le popolazioni di microrganismi commensali e ha modificato anche il contenuto funzionale di geni coinvolti nel controllo metabolico e nell'immunità.

2 STATO DELL'ARTE

2.1 Introduzione al ritmo circadiano e ai geni orologio

2.1.1 Ritmi circadiani

La rotazione della terra intorno al sole della durata di circa 24 ore è stata una delle principali forze evolutive che ha spinto molte specie a sviluppare orologi circadiani intrinseci.

Nelle piante, per esempio, l'espressione ciclica di alcuni geni coinvolti nel processo di fotosintesi è volta a massimizzare l'energia immagazzinata nelle ore di luce. La ritmicità, tuttavia, è un vantaggio anche per gli animali, che, grazie ad essa, possono rispondere anticipatamente ad una domanda energetica che si manifesta nello stesso momento ogni giorno.

Nell'uomo il sistema circadiano è una complessa rete a feedback che consta di interazioni continue tra il sistema nervoso centrale e i tessuti periferici. Attraverso il mantenimento delle attività cellulari in sincronia con le attività dell'organismo (come mangiare e dormire), l'orologio circadiano aiuta a coordinare il sistema di tessuti e organi per ottimizzare le loro performance (Cox and Takahashi, 2019).

La caratteristica principale del ritmo circadiano è che esso persiste per diverso tempo anche in assenza di stimoli esterni; tuttavia, questi stimoli (primo tra tutti la luce) sono importanti per sincronizzare, modificare o attivare tale ritmo.

Nell'uomo sono stati riscontrati ritmi circadiani in diversi tipi cellulari; di conseguenza, molti importanti processi biologici, come la frequenza cardiaca, la temperatura corporea, la pressione sanguigna, il metabolismo e i livelli ormonali, mostrano fluttuazioni giornaliere.

2.1.2 Caratteristiche dell'orologio circadiano

Il sistema circadiano dei mammiferi è costituito da una gerarchia di oscillatori che funzionano a livello cellulare, tissutale e sistemico. Un meccanismo molecolare comune è alla base dell'oscillatore circadiano autonomo delle cellule in tutto il corpo, ma questo sistema di orologi è adattato a diversi contesti funzionali (Mohawk, Green and Takahashi, 2012).

Questi orologi possono essere divisi in 2 componenti principali: l'orologio primario e gli orologi periferici.

- L'orologio primario coinvolge circa 20.000 neuroni, detti oscillatori circadiani, localizzati nel nucleo soprachiasmatico centrale (SCN) dell'ipotalamo; esso funge da pacemaker principale per l'organismo e guida i ritmi di attività e riposo, alimentazione, temperatura corporea e ormoni.
- Gli orologi periferici sono localizzati in tutti i tessuti e mostrano ritmi di espressione genica all'interno delle 24 ore. È interessante come questi ritmi

persistano in coltura, motivo per il quale si suppone che questi oscillatori circadiani siano endogeni.

La luce, il principale segnale “orologio”, raggiunge attraverso la retina i neurotrasmettitori che contattano l’orologio principale, il quale sincronizza di conseguenza gli orologi periferici dispersi per il corpo attraverso segnali neuroumorali. In aggiunta, gli orologi periferici integrano le informazioni ricevute dal cervello con i segnali che arrivano direttamente ai tessuti, come l’assunzione di cibo o l’esercizio fisico.

Il flusso di regolazione agisce quindi in due direzioni: dal cervello agli organi periferici, ma anche dagli organi di senso al cervello, ed è ormai chiaro come l’integrazione dei due segnali abbia un ruolo fondamentale nell’orchestrare il metabolismo e la fisiologia del corpo umano.

2.1.3 Alterazione dell’orologio circadiano

Gli orologi molecolari che controllano i ritmi circadiani si stanno scoprendo essere importanti regolatori dello stato fisiologico o patologico dell’organismo. L’alterazione di questo controllo circadiano è dovuta a diversi fattori tra i quali lavoro notturno, pasti irregolari, viaggi intercontinentali oppure mutazioni genetiche.

Nell’uomo, i ritmi circadiani sono stati ampiamente studiati nel sistema cardiovascolare. Molte funzioni cardiovascolari, come la funzione endoteliale, la formazione di trombi, la pressione sanguigna e la frequenza cardiaca, sono regolate dall’orologio circadiano; quindi, la loro alterazione può provocare diversi scompensi cardio-vascolari. Un ulteriore effetto dimostrato è l’incapacità di controllare i livelli di glucosio nel sangue, con conseguente aumento del rischio di diabete di tipo 2 (Thosar, Butler and Shea, 2018).

2.2 Microbiota

2.2.1 Introduzione

Per microbiota si intende la totalità dei microrganismi (batteri, funghi, protozoi, virus) che colonizzano uno specifico ambiente in un determinato arco di tempo; il microbioma, invece, è il patrimonio genetico del microbiota stesso.

Il microbiologo statunitense Joshua Lederberg coniò il termine “microbiota umano” per indicare la comunità ecologica di microrganismi commensali, simbiotici e patogeni che vivono all’interno o a stretto contatto con il corpo umano (De Fazio M, et al. 2020).

Il microbiota presenta una diversa composizione (tipologia e presenza relativa) a seconda delle regioni dell’organismo in cui è collocato e si distribuisce in modo diverso in base alle caratteristiche chimico-fisiche dei vari distretti corporei

(differenza di pH, luce, disponibilità di ossigeno, sostanze nutritive, ecc.). I tipi di microbiota più studiati sono quello cutaneo, intestinale ed orale.

Recentemente si è scoperto che il microbiota ha un ruolo chiave in molti processi biologici. In particolare, è essenziale per un corretto sviluppo, è in stretta relazione con il sistema immunitario e si ipotizza comunichi direttamente con il cervello.

Inoltre, poiché il corredo di microrganismi presenta una rilevante variabilità interindividuale, molte sono le ricerche che mirano a sviluppare una “medicina personalizzata”, con lo scopo di trattare i pazienti in maniera più mirata ed efficace.

2.2.2 Microbioma orale ed intestinale: analogie e differenze

Il termine microbiota orale indica l'insieme dei microrganismi presenti nella cavità orale umana e nelle sue estensioni contigue. Sterile alla nascita, la cavità orale viene successivamente colonizzata dai microrganismi presenti nell'ambiente circostante, negli alimenti e nell'acqua. L'integrità del microbiota orale viene garantita dal mantenimento di un ambiente ottimale, dipendente dalla presenza di specifici nutrienti e dalla saliva.

Il microbioma salivare è composto da circa 700 specie microbiche, per lo più appartenenti ai cinque phyla: Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Fusobacteria (Takayasu *et al.*, 2017).

La sua composizione è soggetta a piccole variazioni durante tutta la vita ed è abbastanza conservato in individui diversi. È tuttavia molto meno variabile del microbiota intestinale sia a livello di differenze interindividuali, sia nel tempo (L *et al.*, 2021).

I principali fattori che ne determinano la composizione comprendono sia la genetica dell'ospite, che i fattori ambientali come le abitudini alimentari, l'igiene orale, i farmaci assunti ed i livelli di stress.

Sembra inoltre che la composizione microbica vari molto nelle prime fasi della vita, ma che poi, con l'avanzare dell'età, tenda a stabilizzarsi. Il microbioma salivare sembra essere più sensibile, rispetto al microbioma intestinale, ai fattori legati all'ospite piuttosto che all'ambiente.

Le cause della variabilità della comunità microbica orale sono comunque ancora molto discusse.

2.2.3 Composizione del microbiota orale

Il microbiota umano è costituito da un microbiota principale e un microbiota variabile. Il microbiota principale è costituito da specie predominanti che esistono in diversi siti del corpo in individui sani. Il microbiota variabile si è originato in

risposta a uno stile di vita e a determinanti genotipici ed esclusivi di ciascun individuo (Deo and Deshmukh, 2019).

Nel microbiota orale sono state identificate circa 700 specie di procarioti. Quest'ultime appartengono a 185 generi e 12 phyla, di cui circa il 54% sono ufficialmente nominati, il 14% sono senza nome (ma coltivati) e il 32% sono conosciuti solo come filotipi non coltivati. Nell'elenco sono nominati i 12 phyla principali:

- | | | |
|-------------------|-------------------|--------------------------|
| - Firmicutes, | - Actinobacteria, | - SR1, |
| - Fusobacteria, | - Chlamydiae, | - Synergistetes, |
| - Proteobacteria, | - Chloroflexi, | - Saccharibacteria (TM7) |
| - Bacteroidetes, | - Spirochaetes, | - Gracilibacteria (GN02) |

La cavità orale contiene, inoltre, diverse forme di protozoi, funghi e virus. Tra i protozoi, i più comuni sono *Entamoeba gingivalis* e *Trichomonas tenax*, mentre tra i funghi: *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cryptococcus*.

Fusobacterium nucleatum:

Non tutti i microrganismi giocano lo stesso ruolo all'interno della comunità che vive all'interno della bocca; una funzione cruciale sembra essere svolta dal batterio *Fusobacterium nucleatum*.

I fusobatteri sono bacilli anaerobici Gram-negativi e nell'uomo si trovano prevalentemente nella bocca e nel tratto gastrointestinale.

Questo batterio, è presente nell'organismo già dai primi mesi di vita e vive in stretta associazione con le cellule nella bocca; si è notato, in particolare, che esso svolge un ruolo chiave nello stato fisiologico e patologico della cavità boccale (Dessi *et al.*, 2021).

Nel biofilm della placca dentale, *F. nucleatum* svolge un ruolo di supporto strutturale, collegando i colonizzatori primari (come *Streptococcus* sp.) ai colonizzatori secondari, in gran parte anaerobici (es. *Porphyromonas gingivalis*), ai quali può anche legarsi. La sua forma a barra lunga rende *F. nucleatum* fondamentale per facilitare le interazioni tra microrganismi nella creazione del biofilm (Brennan and Garrett, 2019).

3 APPROCCIO SPERIMENTALE:

3.1 Descrizione dell'esperimento:

L'esperimento è stato condotto dal dipartimento di medicina e neurologia "Brigham and Women's hospital" a Boston, USA.

Lo studio, della durata di 14 giorni, ha coinvolto 6 persone (4 uomini e 2 donne), di età compresa tra 18 e 35 anni, in buona salute; nessuno di loro assumeva farmaci, droghe, tabacco etc.

La dieta servita ai partecipanti è stata standardizzata con Harris Benedict formula. Tutti hanno seguito la stessa dieta, anche se adattata ai diversi ritmi sonno-veglia. Per quanto riguarda le restrizioni nell'igiene della bocca, è stato consentito l'uso del collutorio all'inizio di ogni fase; non sono stati consentiti dentifricio e gomme da masticare. La temperatura corporea è stata controllata in tempo reale grazie ad un sensore rettale flessibile.

Gli individui sottoposti allo studio hanno seguito un protocollo costituito da 4 fasi: una fase di pre-studio, un protocollo standardizzato di base, un protocollo di de-sincronizzazione forzato e, infine, una fase di recupero.

Fase di pre-studio

Nelle due settimane precedenti l'inizio del protocollo di laboratorio, i partecipanti hanno dormito nelle loro abitazioni, ma obbligatoriamente 8 ore a notte, e sono stati monitorati alcuni parametri vitali.

Nei 3 giorni precedenti, invece, hanno iniziato a mangiare il cibo preparato dall'ospedale, per iniziare la sperimentazione in una situazione di dieta controllata e standardizzata.

Fasi dell'esperimento

Il protocollo di laboratorio è stato suddiviso temporalmente come segue:

Giorni 1-2:	Giornate normali di 24 ore, 8 ore di sonno.
Giorni 3-4:	Una giornata da 32h + 16 ore di sonno
Giorni 5-6:	Riposo dopo il disallineamento dei giorni precedenti, con opportunità di sonno di 1h dopo pranzo sotto luce soffusa
Giorni 7-11:	Disallineamento forzato con giornate da 28 ore. Al quarto giorno le persone testate erano disallineate di 12 ore.
Giorni 12-14:	Protocollo di post disallineamento con 16 ore di sonno al giorno per recuperare.

Nella figura 1, la tabella dettagliata del lavoro originale.

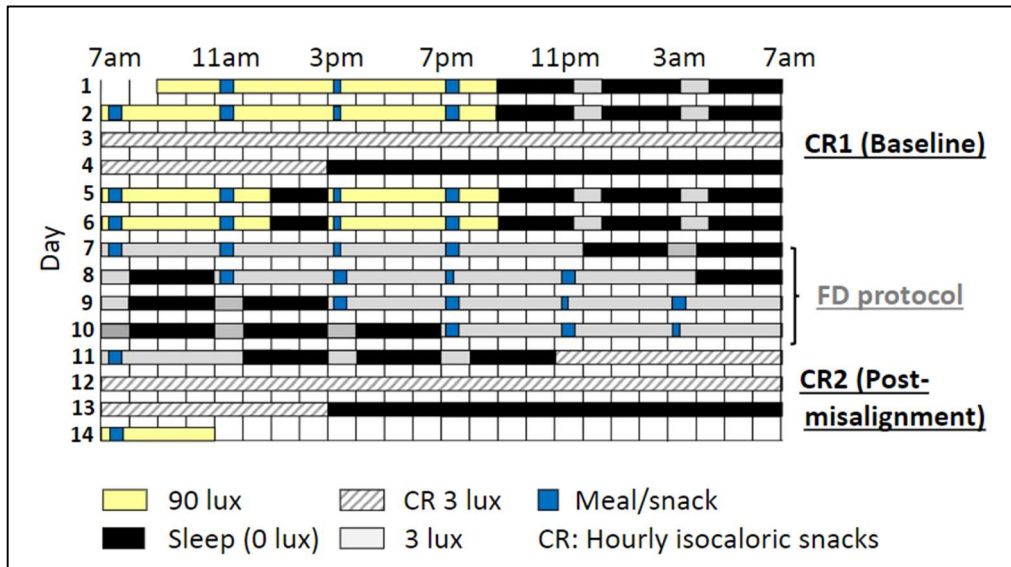


Figura 1: protocollo di laboratorio suddiviso in 14 giorni (asse y) e nelle 24 ore (asse x). Nella legenda, le condizioni a cui sono stati sottoposti i partecipanti.

3.2 Tecniche di biologia molecolare utilizzate nell'esperimento:

3.2.1 Prelievo di saliva (FastDNA bead-beating Spin Kit for Soil)

Per il prelievo di saliva è stato utilizzato il kit di *FastDNA bead-beating*, solitamente utilizzato per isolare il genoma di batteri, funghi ed altri microrganismi da suolo o da altri campioni ambientali.

Il *FastDNA Spin Kit for Soil* contiene tubi di matrice di lisi e tutti i reagenti necessari per estrarre il DNA in un processo che rimuove, in modo efficiente, gli acidi umici e altri inibitori della PCR, ovvero sostanze che potrebbero danneggiare gli acidi nucleici all'interno del campione.

La matrice di lisi è utilizzata per rompere le membrane cellulari e funziona molto bene con campioni misti; è molto efficace anche con organismi storicamente difficili da isolare come spore ed endospore, batteri Gram positivi, lieviti, alghe, nematodi e funghi.

3.2.2 Quantificazione dell'estratto (Qubit)

Qubit Fluorometers rileva i diversi segnali fluorescenti specifici per il target di interesse. L'emissione viene generata solo se la soluzione lega le sequenze di interesse, anche a basse concentrazioni; questo consente di evitare di ripetere l'esperimento a causa di misurazioni imprecise.

I fluorometri *Qubit* sono molto più sensibili della quantificazione tramite assorbanza UV, che misura ogni molecola che assorbe a 260 nm: DNA, RNA, proteine, nucleotidi liberi o sali in eccesso.

3.2.3 PCR pair end della regione V4 del rRNA

Un aspetto critico durante un'analisi di profilazione di una comunità microbica è la scelta della regione dell'RNA ribosomiale 16S da sequenziare.

La regione V4 è la più utilizzata, in quanto fornisce un profilo rappresentativo delle diverse comunità a livello genico. Utilizzando questa regione, tuttavia, si riesce ad indagare la diversità solo a livello di taxa. Per una identificazione più precisa, ogni specie ha un regione di riferimento; ad esempio, per *Streptococcus*, è più indicata da regione V2 (Wade and Prosdocimi, 2020).

In questo esperimento è stato utilizzato un gene dell'RNA ribosomiale 16S modificato con dei primer distanziatori esterni trascritti, che funzionano molto bene con archea, batteri e funghi. Per la messa in atto di questa tecnica sono stati spostati dei bar-codes sui primer all'estremità 5', consentendo così diversi possibili accoppiamenti con il primer 3'. In questo caso è stata utilizzata la coppia di primers 515FB/806RB (515FB: GTGYCAGCMGCCGCGGTAA; 806RB: GGACTACNVGGGTWTCTAAT), in grado di amplificare le regioni variabili 4 e 5 del gene 16S rRNA dei microrganismi con una ottima efficienza.

L'approccio di sequenziamento mirato dell'amplicone (TAS) è semplice ed economico. La TAS è un processo PCR in due fasi che consente ai ricercatori di amplificare una regione genica mirata (amplicone) utilizzando la PCR tradizionale, seguita da una PCR aggiuntiva che allega un tag noto da 10 bp, un codice a barre o un MID per identificare gli ampliconi da diversi campioni (taxa, nel nostro caso). Questo metodo permette la produzione di ampliconi "etichettati" che sono pronti per essere sequenziati direttamente utilizzando una piattaforma di nuova generazione, senza fasi di preparazione dell'amplicone estesi o l'acquisto di ogni possibile combinazione di primer specifico per locus MID (Bybee *et al.*, 2011).

3.2.4 Purificazione della libreria ottenuta (AMPure XP cleanup protocol)

Questo prodotto è basato sull'utilizzo di biglie paramagnetiche SPRI, brevettate per rimuovere i contaminanti (dNTP, sali, primer, dimeri di primer) ed è stata pensata per la purificazione di prodotti di sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS).

3.2.5 Sequenziamento illumina (MiniSeq flow cell) + ri-sequenziamento

MiSeq è uno strumento di sequenziamento di nuova generazione prodotto da *Illumina*. Esso utilizza la tecnologia "sequencing by synthesis" per fornire soluzioni di sequenziamento end-to-end. Lo strumento di sequenziamento *Illumina* permette un sequenziamento di moltissime *reads* in parallelo, utilizzando un metodo che rileva ogni singola base mentre viene incorporata in un filamento di DNA in crescita.

Il sequenziamento *pair-end* consente agli sperimentatori di sequenziare entrambe le estremità di un frammento genico, e di generare sequenze di alta qualità facilmente allineabili. La lunghezza di ognuna delle *reads* nell'esperimento in esame è stata di 153 paia di basi. Il sequenziamento *paired-end* facilita la rilevazione di riarrangiamenti genomici ed elementi di sequenza ripetitivi, nonché di fusioni geniche e nuove trascrizioni.

Oltre a produrre il doppio del numero di reads nello stesso tempo, le sequenze allineate come coppie di *reads* consentono un allineamento di lettura più accurato e la capacità di rilevare varianti di inserzione e delezione, cosa molto più complessa con i sequenziamenti a lettura singola.

3.2.6 Analisi bioinformatiche

Sono state effettuate diverse analisi bioinformatiche sul prodotto di sequenziamento grezzo; queste hanno permesso di escludere le sequenze troppo corte (minori di 250 bp).

Le sequenze sono state raggruppate nell'unità tassonomica operativa (OTU operational taxonomic units) utilizzando uno specifico algoritmo (Usearch8.1) e poi, successivamente, classificate con maggior dettaglio e rappresentati con la matrice BIOM (biological observation matrix).

3.2.7 Analisi statistiche

L'analisi *cosinor* utilizza il metodo dei minimi quadrati per adattare un'onda sinusoidale a serie temporali. L'analisi del coseno, spesso utilizzata per le variabili governate da ritmi circadiani e da altri ritmi biologici, è un modello non lineare nei parametri di ampiezza e acrofase, che ha una rappresentazione lineare alla trasformazione.

Con l'analisi di *cosinor* lineare, l'ampiezza e l'acrofase per ogni armonica possono essere calcolate come funzioni non lineari dei coefficienti di regressione lineare stimati. Qui viene considerato un approccio flessibile al modello misto all'analisi *cosinor*, in cui i parametri di effetto fisso possono entrare non linearmente come acrofase e ampiezza per ogni armonica o linearmente dopo la trasformazione in coefficienti di regressione.

L'analisi del coseno utilizzata nell'esperimento ha impiegato un seno ed un coseno con ampiezza 24 ore, per identificare un effetto circadiano. I dati sono stati comunque normalizzati per minimizzare le differenze tra individui.

4 RISULTATI DEL LAVORO

4.1 *Il microbiota orale mostra una ritmicità circadiana endogena*

Per verificare se vi fosse una ritmicità circadiana endogena si è presa in considerazione la baseline Control Routine, ovvero la prima fase dell'esperimento, nella quale gli individui venivano sottoposti a una routine con ritmo sonno-veglia regolare. È stata osservata una ritmicità circadiana endogena significativa nell'abbondanza relativa di 1 dei 5 principali phyla (Proteobacteria), e di 3 dei 14 genera dominanti: *Neisseria*, *Fusobacterium* e *Streptococcus* (Figura 2).

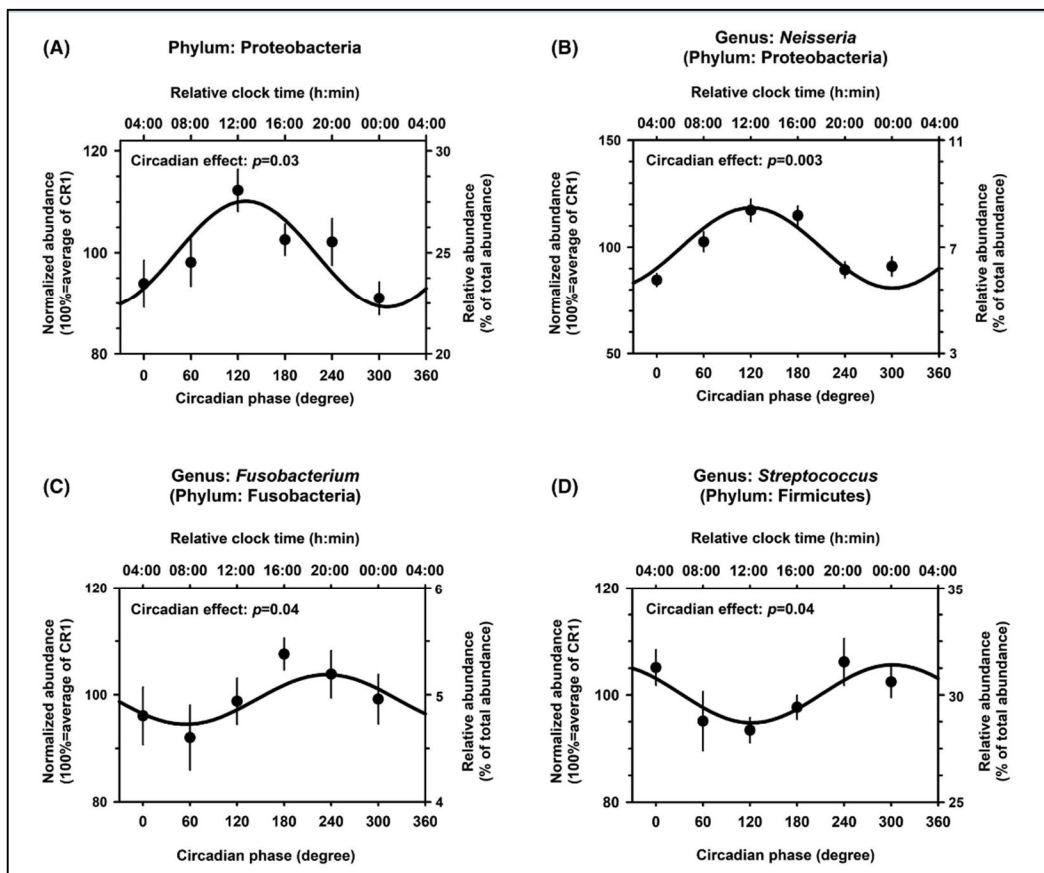


Figura 2: rappresentazione della ritmicità di 1 phylum (*Proteobacteria*) e di 3 genera (*Neisseria*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*) dei quali è stata normalizzata l'abbondanza relativa all'interno delle 24 ore. In ascissa è presente la fase circadiana, in ordinata l'abbondanza normalizzata.

4.2 Effetto del disallineamento circadiano

Nell'esperimento sono stati prelevati i campioni di saliva ogni 4 ore per tutta la durata del protocollo; sono state osservate delle differenze rilevanti nella composizione della comunità microbica presente precedentemente e successivamente al protocollo di de-sincronizzazione forzato.

Nell'esperimento, in particolare, è stato osservato che 4 dei 5 phyla dominati (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*) e 8 dei 14 genera dominanti hanno subito un significativo effetto di disallineamento; ciò indica un effetto diffuso nell'abbondanza relativa delle popolazioni del microbiota.

Per esempio, l'abbondanza relativa di Firmicutes è diminuita, mentre è aumentata quella di Proteobacteria, Bacteroidetes e Fusobacteria.

Le analisi di beta diversità hanno indicato un disallineamento circadiano nelle comunità del microbiota salivare sia tra individui diversi, sia a livello di gruppo. Questo risulta particolarmente interessante perché lo stesso trattamento ha determinato effetti leggermente diversi in individui diversi.

Il disallineamento forzato ha anche portato ad una diminuzione della diversità del microbiota orale; si tratta della alpha diversità, ovvero il numero totale di specie presenti all'interno della cavità orale (figura 3-4)

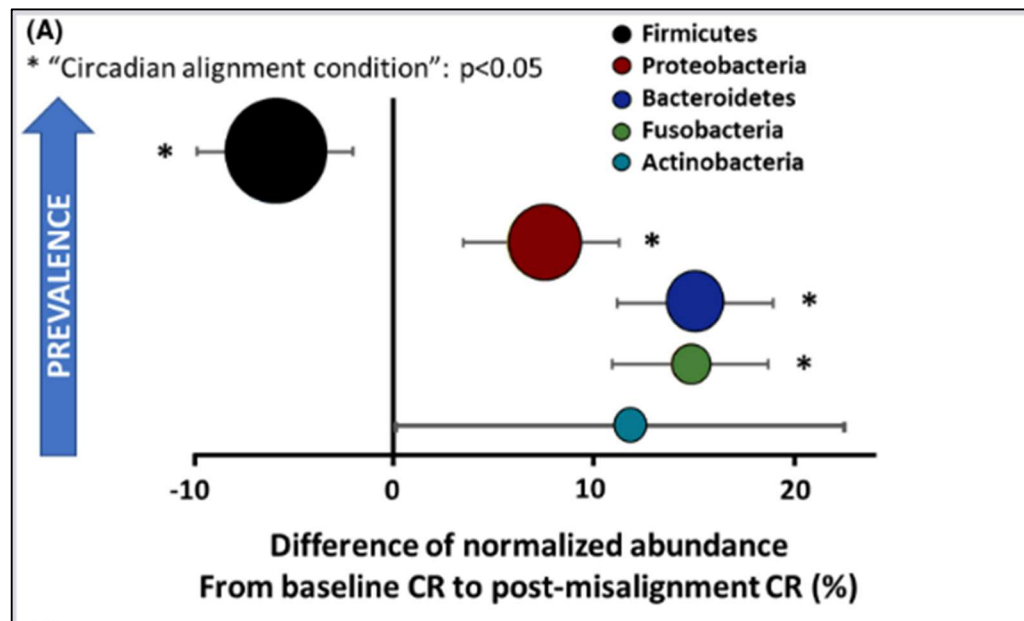


Figura 3: effetto del disallineamento sulla composizione del microbiota umano, a livello di phyla.

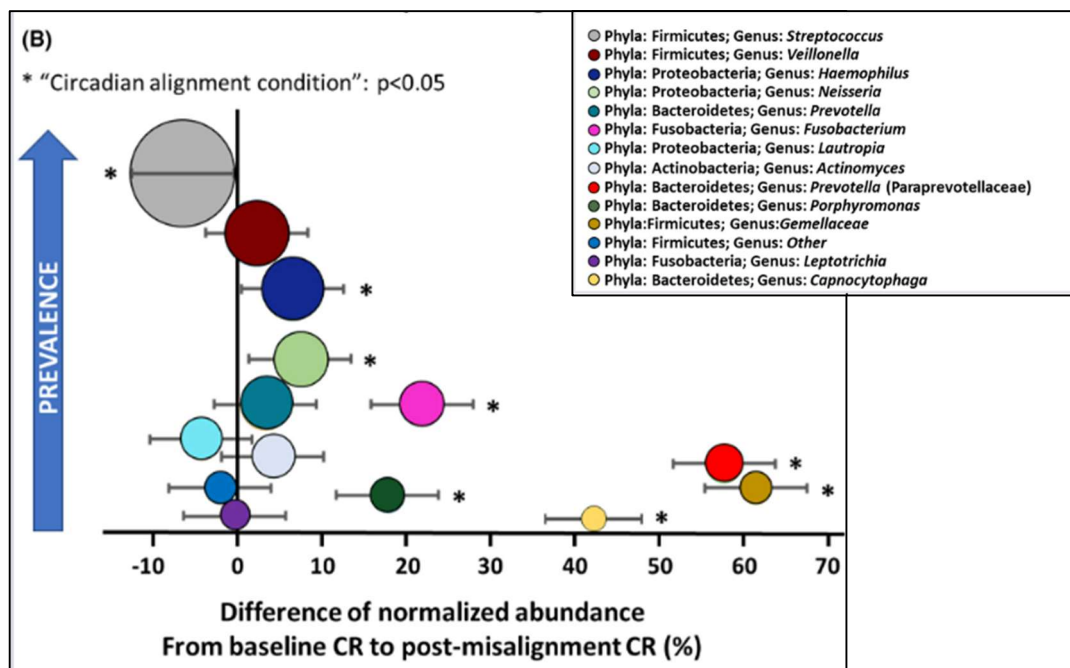


Figura 4: effetto del disallineamento sulla composizione del microbiota umano, a livello di genere.

4.3 Impatto del disallineamento circadiano sui pathways funzionali associati alla composizione del microbiota

Il lavoro ha inoltre investigato l'effetto del disallineamento circadiano nel contenuto funzionale del microbioma orale. L'abbondanza relativa di 15 pathways funzionali è significativamente cambiata ($p < 0.05$) dalla fase di routine costante (inizio dell'esperimento) alla fase di post disallineamento (fine esperimento).

Il disallineamento circadiano ha ridotto l'abbondanza relativa di 5 pathways funzionali:

- biosintesi di fenilalanina, tirosina e triptofano
- esportazioni delle proteine
- metabolismo dei glicero-lipidi
- replicazione, ricombinazione e riparazione delle proteine
- metabolismo della tiamina

Non è ancora stato chiarito come il disallineamento circadiano abbia però aumentato alcuni pathways funzionali:

- metabolismo del zolfo
- catabolismo di alcuni acidi grassi a lunga catena
- ciclo patogenico di *Vibrio cholerae*
- biosintesi dell'acido lipoico
- antigeni cellulari
- biosintesi di molecole strutturali rilevanti nella segnalazione cellulare

5 DISCUSSIONE

5.1 Cause della ritmicità del microbioma orale

Sono stati svolti diversi esperimenti analoghi, tra i quali, per esempio, quello pubblicato nella rivista *Oxford Academics* nel 2017 (Takayasu *et al.*, 2017). In questo studio, analogamente a quello appena analizzato, sono stati testati 6 individui, che sono stati sottoposti ad una routine costante, per verificare se esistesse una ritmicità nella composizione del loro microbiota orale.

Molto interessante il fatto che l'oscillazione circadiana, presente in vivo, è stata completamente cancellata incubando la saliva di 2 individui in vitro; ciò suggerisce che l'oscillazione osservata non sia un processo autonomo, bensì causato da cambiamenti fisiologici dell'ospite.

5.2 Medicina personalizzata

Il microbiota orale, ma soprattutto quello intestinale, hanno delle caratteristiche peculiari che li rendono molto interessanti per ricercatori e aziende farmaceutiche.

La caratteristica principale è quella di essere piuttosto variabile da persona a persona, ma anche facilmente modificabile dalle abitudini del singolo (dieta, sonno, ambienti frequentati). Inoltre il microbiota è implicato in numerosi pathways metabolici, sia in stato fisiologico, ad esempio digestione e metabolismo, che patologico, ad esempio in malattie gastrointestinali, metaboliche e malattie immunologiche.

Per le caratteristiche appena elencate, si tratta di un perfetto target per quella che viene definita “medicina personalizzata”, ovvero un tipo di medicina che prevede misure diagnostiche e terapeutiche commisurate in modo ottimale e personalizzato ad ogni individuo.

Ad esempio, sono state teorizzate diverse “diete del microbioma”, nelle quali i diversi nutrienti sono adattati alla particolare comunità microbica presente in ogni persona. Si attendono per il futuro anche farmaci e alte molecole bioattive studiate in risposta alla necessità di un piccolo gruppo di individui che condividono un simile microbiota.

5.3 Rapporto tra microbiota ed alimentazione

Mentre la dieta influenza il microbioma orale, dati recenti indicano che il microbioma orale possa influenzare anche le preferenze alimentari del suo ospite.

Alcuni batteri, come alcune specie di *Clostridia* e *Prevotella*, sono stati associati a preferenze di gusto, come dolce, aspro, salato e amaro, rappresentando plausibilmente un meccanismo attraverso il quale il microbiota orale influenza le

preferenze alimentari per sostenere la sua appartenenza e persistenza nella cavità orale (C *et al.*, 2019).

5.4 Selezione del campione

L'esperimento di Chellappa *et al.*, oggetto di questo elaborato, è stato realizzato su un numero di individui alquanto limitato; sono infatti state testate 6 persone, sia maschi che femmine, e tutti di età compresa tra i 18 ed i 35 anni.

Questo potrebbe rappresentare un limite in quanto non è possibile arrivare a delle conclusioni statisticamente robuste. Con un campione più numeroso sarebbe stato molto interessante capire come varia la beta-diversità; in altre parole, sarebbe stato possibile quantificare la variabilità tra diverse persone nel protocollo di base, ma anche la moltitudine di risposte differenti allo stesso protocollo di disallineamento forzato su una popolazione più varia di individui.

In questo caso sarebbe interessante indagare se gruppi di individui, per esempio accomunati da sesso o età manifestino le medesime variazioni al trattamento.

Un'altra interessante variante dell'esperimento trattato è quello pubblicato dalla rivista *Nature* (Asnicar *et al.*, 2021), nel quale vengono analizzati, tra i tanti individui, anche molti gemelli omozigoti. Si è visto come la composizione del microbiota (intestinale) sia influenzato molto di più dal contesto ambientale (persone e luoghi frequentati) piuttosto che dal contesto genetico.

6 BIBLIOGRAFIA

Asnicar, F. *et al.* (2021) 'Microbiome connections with host metabolism and habitual diet from 1,098 deeply phenotyped individuals', *Nature Medicine*, 27(2), pp. 321–332. doi:10.1038/s41591-020-01183-8.

Brennan, C.A. and Garrett, W.S. (2019) 'Fusobacterium nucleatum — symbiont, opportunist and oncobacterium', *Nature reviews. Microbiology*, 17(3), pp. 156–166. doi:10.1038/s41579-018-0129-6.

Bybee, S.M. *et al.* (2011) 'Targeted Amplicon Sequencing (TAS): A Scalable Next-Gen Approach to Multilocus, Multitaxa Phylogenetics', *Genome Biology and Evolution*, 3, pp. 1312–1323. doi:10.1093/gbe/evr106.

C, C. *et al.* (2019) 'New insights into the relationship between taste perception and oral microbiota composition', *Scientific reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-40374-3.

Cox, K.H. and Takahashi, J.S. (2019) 'Circadian Clock Genes and the Transcriptional Architecture of the Clock Mechanism', *Journal of molecular endocrinology*, 63(4), pp. R93–R102. doi:10.1530/JME-19-0153.

Deo, P.N. and Deshmukh, R. (2019) 'Oral microbiome: Unveiling the fundamentals', *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 23(1), pp. 122–128. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_304_18.

Dessi, A. *et al.* (2021) 'Fusobacterium nucleatum and alteration of the oral microbiome: from pregnancy to SARS-COV-2 infection', *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(13), pp. 4579–4596. doi:10.26355/eurrev_202107_26251.

L, S. *et al.* (2021) 'The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease', *Periodontology 2000*, 87(1). doi:10.1111/prd.12393.

Mohawk, J.A., Green, C.B. and Takahashi, J.S. (2012) 'CENTRAL AND PERIPHERAL CIRCADIAN CLOCKS IN MAMMALS', *Annual review of neuroscience*, 35, pp. 445–462. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153128.

Takayasu, L. *et al.* (2017) 'Circadian oscillations of microbial and functional composition in the human salivary microbiome', *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 24(3), pp. 261–270. doi:10.1093/dnares/dsx001.

Thosar, S.S., Butler, M.P. and Shea, S.A. (no date) 'Role of the circadian system in cardiovascular disease', *The Journal of Clinical Investigation*, 128(6), pp. 2157–2167. doi:10.1172/JCI80590.

Wade, W.G. and Prosdocimi, E.M. (2020) 'Profiling of Oral Bacterial Communities', *Journal of Dental Research*, 99(6), pp. 621–629. doi:10.1177/0022034520914594.

De Fazio M, Pipicelli M, Cerchiaro A, et al. *Microbiota, salute orale e nutrizione. Attualità in Dietetica e Nutrizione - Clinica* 2020;12:15-19.