



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Cliniche

CICLO XXXII

COORDINATORE Prof. Marco Matucci Cerinic

***Gut microbiota and immune response in human model of colon  
inflammatory: Potential and Celiac disease, Polyps and Cancer***

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

**Dottorando**

Dott. Ricci Federica

**Tutor**

Prof. Amedei Amedeo

**Coordinatore**

Prof. Matucci Cerinic Marco

Anni 2016/2019

# **INDICE**

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Microbiota intestinale e sistema immunitario</i>	1
1.1.1 <i>Microbiota intestinale</i>	1
1.1.2 <i>Sistema immunitario</i>	3
1.1.3 <i>Interazione tra il microbiota intestinale e la risposta immunitaria</i>	7
1.1.3.1 <i>Microbiota intestinale ed immunità innata</i>	8
1.1.3.2 <i>Microbiota intestinale ed immunità specifica</i>	10
1.1.3.3 <i>Microbiota ed immunosorveglianza nelle neoplasie</i>	11
1.1.3.4 <i>Microbiota ed autoimmunità</i>	15
1.2 <i>Carcinoma coloretale</i>	16
1.2.1 <i>Eziologia</i>	16
1.2.2 <i>Prevenzione del carcinoma coloretale</i>	19
1.2.3 <i>Patogenesi</i>	20
1.2.4 <i>Manifestazioni cliniche e prognosi</i>	21
1.2.5 <i>Terapia</i>	22
1.3 <i>Celiachia</i>	24
1.3.1 <i>Eziologia</i>	25
1.3.2 <i>Patogenesi</i>	26
1.3.3 <i>Manifestazioni cliniche e diagnosi</i>	27
1.3.4 <i>Terapia</i>	29
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>31</b>
3.1 <i>Casistica</i>	31
3.2 <i>Caratterizzazione fenotipica e funzionale dell'infiltrato linfocitario</i>	35
3.3 <i>Caratterizzazione dei linfociti T circolanti</i>	37
3.4 <i>Analisi del microbiota intestinale</i>	38
3.5 <i>Analisi statistica dei dati</i>	39
<b>4. RISULTATI</b>	<b>41</b>
4.1 <i>Analisi della risposta immunitaria e del microbiota intestinale nei pazienti con carcinoma coloretale</i>	41
4.1.1 <i>Analisi dell'infiltrato linfocitario nei pazienti con CRC e nei CM</i>	42
4.1.2 <i>Analisi dei linfociti T circolanti nei pazienti con CRC</i>	44
4.1.3 <i>Analisi molecolare della risposta immunitaria nei pazienti con CRC</i>	46
4.1.4 <i>Analisi del microbiota intestinale</i>	48
4.1.4.1 <i>Comparazione del microbiota orale, fecale e tissutale nei pazienti con CRC</i>	48

<i>4.1.4.2 Analisi del microbiota tissutale dei pazienti con CRC</i>	53
<i>4.1.5 Discussione</i>	58
<i>4.2 Analisi della risposta immunitaria e del microbiota intestinale nei pazienti con celiachia</i>	64
<i>4.2.1 Analisi ex vivo dell'infiltrato linfocitario T nei pazienti con MC</i>	65
<i>4.2.2 Analisi molecolare della risposta immunitaria nei pazienti con MC</i>	67
<i>4.2.3 Discussione</i>	69
<b>5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</b>	<b>72</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>73</b>

# 1. INTRODUZIONE

## ***1.1 Microbiota intestinale e sistema immunitario***

### ***1.1.1 Microbiota intestinale***

Il microbiota intestinale (MI) è un ecosistema complesso formato da batteri, virus, funghi e protozoi che si sono adattati a vivere nella mucosa e nel lume intestinale (Lozupone *et al*, 2012).

MI ha significativi effetti su molti aspetti della fisiologia umana: è coinvolto nella sintesi di molecole bioattive (acidi grassi a catena corta, disaccaridi, oligosaccaridi, alcoli, idrogeno, anidride carbonica, vitamine), nella fermentazione di polisaccaridi non digeribili (cellulosa, xilani, amido resistente, inulina), nella regolazione del metabolismo enteroepatico, nella degradazione di composti xenobiotici, nel mantenimento dell'integrità della barriera intestinale (che fornisce protezione nei confronti di agenti patogeni), nel metabolismo di farmaci e tossine e soprattutto, modula lo sviluppo del sistema immunitario e la tolleranza immunitaria. Differenti dati suggeriscono che il modo in cui si verifica la colonizzazione della mucosa durante l'infanzia possa influenzare il sistema immunitario per il resto della vita, creando un'educazione immunitaria più o meno appropriata ed una diversa suscettibilità alle malattie (Gensollen *et al*, 2016).

Il microbiota intestinale è un sistema dinamico in continua evoluzione che origina immediatamente dopo la nascita e progredisce, nell'arco della vita, da piccola comunità iniziale ad ecosistema:

- al momento della nascita, è il parto ad influenzare la composizione del microbiota (Palmer *et al*, 2007; Dominguez-Bello *et al*, 2010): nei bambini nati con parto naturale è costituito da una piccola comunità microbica identica al microbiota delle vie genitali della madre (microbiota caratterizzato da *Lactobacillus spp.*, *Prevotella spp.*, *Atopobium spp.* e *Sneathia spp.*); nei bambini nati con parto cesareo è formato da comunità microbiche simili a quelle della pelle del genitore (*Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Propionibacterium spp.*);
- con l'allattamento e lo svezzamento si arricchisce (Cresci *et al*, 2015; Martin *et al*, 2009; Yasmin *et al*, 2017): se i neonati sono allattati al seno ricevono le comunità microbiche colonizzanti la superficie del seno, le specie batteriche contenute nel latte, oligosaccaridi che stimolano selettivamente la crescita di specie appartenenti al genere *Bifidobacterium*, le quali proteggono la mucosa intestinale dall'attacco di microrganismi

patogeni; se i neonati sono allattati con latte artificiale, il microbiota intestinale si arricchisce di *Veillonellaceae* e *Clostridiaceae* e presenta una minore diversità batterica intestinale;

- nell'età adulta si completa e resta stabile ma presenta una composizione ed una densità diversa nei vari tratti intestinali: a livello del digiuno prossimale, si riscontrano circa  $10^3$ - $10^5$  UFC/ml identificate principalmente nelle specie appartenenti ai generi *Streptococcus*, *Veillonella*, *Escherichia* ed *Enterobacter* (Sundin *et al*, 2017; Quigley, 2014); a livello dell'ileo la carica microbica è pari a  $10^6$ - $10^{12}$  UFC/ml ed è principalmente caratterizzata da microrganismi appartenenti ai generi *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Solobacterium*, *Rothia* e *Gemella* (Villmones *et al*, 2018); a livello del colon, dove il microambiente è meno acido, si riscontra una densità microbica maggiore pari a  $10^{14}$  UFC/ml e rappresentata principalmente da batteri appartenenti ai phyla *Firmicutes* (composto da microrganismi Gram-positivi), *Bacteroidetes* (composto da microrganismi Gram-negativi anaerobi), *Actinobacteria* (composto da microrganismi Gram-positivi, filamentosi e con crescita miceliare) e *Proteobacteria* (composto da microrganismi Gram-negativi che comprendono sia batteri della normale composizione microbica intestinale sia batteri patogeni come *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia*) (Morgan *et al*, 2013; Ringel *et al*, 2015; Rizzatti *et al*, 2017). La diversità microbica si osserva, non solo nei diversi distretti intestinale, ma anche tra il lume e la mucosa intestinale: mentre *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Ruminococcus spp.* sono i microrganismi prevalenti nello spazio luminale, a livello della mucosa e delle ghiandole intestinali si ritrovano i generi *Clostridium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.* e *Akkermansia spp.* (Jandhyala *et al*, 2015);
- durante l'invecchiamento subisce modifiche: si assiste ad un aumento di Enterobacteriaceae e ad un decremento progressivo di *Bacteroides spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* Tali cambiamenti, sono principalmente legati a scelte alimentari diverse rispetto all'età adulta (scelte dovute ad una capacità masticatoria ridotta, ad una ridotta presenza dentaria), ad una digestione rallentata che determina un tempo di transito intestinale allungato che porta a modificazioni (Palmer *et al*, 2007; Perez Martinez *et al*, 2014; Jeffery *et al*, 2016).

### ***1.1.2 Sistema immunitario***

Il sistema immunitario (SI) è costituito da componenti cellulari e molecolari che cooperano tra loro al fine di difendere l'organismo dagli agenti esterni potenzialmente dannosi.

Per svolgere le sue funzioni, il SI ha sviluppato due meccanismi di difesa: l'immunità innata e l'immunità adattativa.

L'immunità innata (detta anche naturale, congenita, aspecifica) è presente negli organismi fin dalla nascita, non dà luogo a memoria immunitaria, è la prima risposta che l'organismo attua in caso di infezione ed agisce nell'arco di poche ore. È costituita dalle barriere epiteliali, dalle cellule ad attività fagocitica (principalmente neutrofili e macrofagi), dalle cellule ad attività citotossica naturale (natural killer, NK) e da numerose proteine ematiche (tra cui quelle del sistema del complemento).

L'immunità acquisita (detta anche adattativa, specifica) sviluppa in risposta alle infezioni nell'arco di alcuni giorni. È caratterizzata da un'elevata specificità di riconoscimento e da memoria immunitaria: la sua efficacia, a differenza dell'immunità innata, aumenta in seguito ad esposizioni ripetute di uno stesso antigene. Comprende due tipi di risposte immunitarie: l'immunità umorale e l'immunità cellulare (detta anche cellulo-mediata). L'immunità umorale è mediata dai linfociti B che producono molecole circolanti capaci di neutralizzare ed eliminare i microbi extracellulari e le loro tossine: gli anticorpi. L'immunità cellulare è mediata, invece, dai linfociti T ed è coinvolta nell'eliminazione di microbi intracellulari che vivono e proliferano all'interno delle cellule dell'organismo ospite.

I linfociti T e B sono dunque i mediatori dell'immunità acquisita, originano a livello del midollo osseo da un precursore linfocitario comune e maturano in sedi distinte: i linfociti B maturano nella sede di origine, i linfociti T migrano e maturano nel timo.

Sia i linfociti B che T sono geneticamente programmati per riconoscere uno specifico antigene ed il riconoscimento avviene grazie a recettori di membrana detti TCR (nei linfociti T) e BCR (nei linfociti B).

❖ Nei **linfociti T**, il TCR si lega ad un complesso molecolare espresso sulla superficie di cellule presentanti l'antigene (APC) e formato da un peptide antigenico legato ad una molecola del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Nel 95% delle cellule T il TCR è un eterodimero costituito da una catena polipeptidica  $\alpha$  ed una  $\beta$ , ognuna delle quali possiede una regione variabile (in cui si lega l'antigene) ed una

costante. Una piccola percentuale di linfociti T possiede un TCR composto dalle catene polipeptidiche  $\gamma$  e  $\delta$  ed in grado di riconoscere l'antigene senza alcuna presentazione da parte di molecole MHC. Sia i  $\text{TCR}\alpha\beta$  sia i  $\text{TCR}\gamma\delta$  sono legati non covalentemente ad un gruppo di cinque catene polipeptidiche, denominato complesso molecolare CD3, coinvolto nella trasduzione del segnale all'interno della cellula T, una volta avvenuto il legame TCR-antigene. Oltre alle proteine del CD3, le cellule T esprimono una varietà di altre molecole non polimorfiche come CD4, CD8, CD2, CD11a, CD28 ed il legando del CD40 (CD40L).

Il CD4 e CD8 sono particolarmente importanti: servono da corecettori nell'attivazione dei linfociti. Sono espresse in maniera mutualmente esclusiva su due gruppi di cellule T: i linfociti Thelper (Th,  $\text{CD4}^+$ ) ed i linfociti Tcitotossici (Tc,  $\text{CD8}^+$ ). Durante la presentazione dell'antigene, le molecole CD4 si legano alle regioni non polimorfiche delle molecole MHC di classe II mentre le molecole CD8 legano a molecole MHC di classe I. Le molecole MHC di classe II sono espresse sulla membrana di cellule dendritiche, sui linfociti B, sui macrofagi e riconoscono peptidi derivanti dalla degradazione di proteine extracellulari (antigeni di origine esogena); le molecole MHC di classe I sono espresse sulla membrana di tutte le cellule nucleate e riconoscono peptidi derivanti dalla degradazione di proteine cellulari (antigeni di origine endogena) ma possono riconoscere anche antigeni esogeni, inclusi gli antigeni tumorali, in un meccanismo definito "*cross-priming*" o cross-presentazione.

Nell'uomo esistono tre geni codificanti per molecole MHC di classe I (gene HLA-A, HLA-B e HLA-C), e tre geni codificanti per molecole MHC di classe II (gene HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ). Ognuno di questi geni è altamente polimorfico ed ogni individuo possiede due alleli per ciascuna molecola MHC. Ogni molecola MHC possiede una diversa affinità per l'antigene, ed un peptide può legarsi ad una molecola HLA-A1 ma non ad una molecola HLA-A2. Ne consegue che il set di antigeni che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario di due individui geneticamente diversi è differente. Una volta avvenuto il legame tra il TCR dei linfociti T ed il complesso peptide antigenico-MHC, affinché avvenga l'attivazione linfocitaria, occorrono segnali costimolatori che vengono forniti dall'interazione di molecole espresse sulla cellula T con i rispettivi ligandi presenti sulla cellula APC. Tra le interazioni costimolatorie più note ci sono quelle tra: CD11a/CD18 (LFA-1) e CD54 (ICAM-1), CD2 e CD58 (LFA-3), CD28 e CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2).

Le interazioni con le cellule costimolatorie determinano l'attivazione ed il differenziamento dei linfociti T:

1) I linfociti Th (che rappresentano il 60% dei linfociti CD3<sup>+</sup>), a seconda dei segnali e dei costimoli ricevuti durante il riconoscimento dell'antigene, differenziano in sottopopolazioni di cellule effettrici che esplicano la loro attività secernendo citochine. Le sottopopolazioni meglio definite e caratterizzate da un differente pattern citochinico sono: Th1, Th2, Th17, Th22 e T regolatorie (Treg).

Thelper 1 (Th1). Sono linfociti T coinvolti nella risposta immunitaria contro patogeni intracellulari, sono responsabili di malattie autoimmuni e di reazioni infiammatorie ma possono esercitare anche funzioni citotossiche dirette principalmente attraverso l'induzione dell'apoptosi della cellula presentante l'antigene, mediante il legame Fas/Fas ligando (Abbas AK *et al*, 2000). Sono caratterizzati dalla produzione di interferone gamma (IFN- $\gamma$ ), di interleuchina 2 (IL-2), del fattore di necrosi tumorale-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e dall'espressione del fattore di trascrizione T-bet. Nel loro differenziamento da T *naive* a cellule Th1 è coinvolta l'interleuchina 12 (IL-12) ed i fattori trascrizionali STAT4 e T-bet durante l'incontro con l'antigene (Szabo *et al*, 2003). L'attivazione di T-bet è critica per il differenziamento della cellula verso il fenotipo Th1; essa determina: i) l'up-regolazione del recettore  $\beta$ 2 per IL-12 (IL-12 $\beta$ 2R), che conferisce alla cellula responsività all'IL-12 e sostiene l'espressione di T-bet (Lazarevic *et al*, 2011); ii) la produzione di IFN- $\gamma$ ; iii) l'espressione di geni codificanti per il recettore chemochinico CXCR3 e per le chemochine CCL3 e CCL4 (Jenner *et al*, 2009), responsabili della mobilitazione delle cellule Th1 verso il sito tumorale.

Thelper 2 (Th2). Le cellule Th2 sono coinvolte nella difesa contro i parassiti extracellulari, nell'induzione e persistenza dell'asma, nelle malattie allergiche. Sono caratterizzati dalla produzione di citochine responsabili del coordinamento dell'immunità umorale e delle risposte infiammatorie allergiche: interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 5 (IL-5) ed interleuchina 13 (IL-13). L'IL-4 è la citochina determinante nella differenziazione verso il fenotipo Th2, agendo attraverso l'attivazione dei fattori trascrizionali STAT6 e GATA-3 (Zheng *et al* 1997; Kaplan *et al*, 1996).

Thelper 17 (Th17). Sono un sottogruppo di cellule Th che produce interleuchina 17 A (IL-17A), interleuchina 17 B (IL-17B), interleuchina 21 (IL-21), interleuchina 22 (IL-22) e interleuchina 26 (IL-26); che esprime il marker di superficie CD161 (Annunziato *et al*, 2008) ed alti livelli del recettore chemochinico CCR6, utile per il reclutamento di queste cellule nel sito di crescita tumorale ed infiammatorio (Annunziato *et al*, 2012; Acosta

Rodriguez *et al*, 2007); che esprime il fattore di trascrizione ROR $\gamma$ t, che induce la produzione delle citochine caratteristiche di questo gruppo di cellule T ed inibisce la produzione di IFN- $\gamma$  da parte di cellule T *naive* (Manel *et al*, 2008). Nell'uomo, ad essere coinvolte nella differenziazione delle cellule Th17, sono necessarie le citochine interleuchina 6 (IL-6), interleuchina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleuchina 21 (IL-21) (Acosta Rodriguez *et al*, 2007; Korn *et al*, 2007).

Thelper 22 (Th22). Sono cellule Th secernenti interleuchina 22 (IL-22), indipendentemente da IL-17. Esprimono l'antigene linfocitario cutaneo (*cutaneous lymphocyte antigen*, CLA), un ligando della E-selectina coinvolto nel processo emostatico, e recettori per chemochine come CCR6, CCR4 e CCR10, che complessivamente facilitano la migrazione di queste cellule nei siti infiammati (Duhon *et al*, 2009). Sono state riscontrate in pazienti con disordini infiammatori della pelle, dell'intestino e delle articolazioni ed in differenti neoplasie (Sonnenberg *et al*, 2011; Eyerich *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2008; Miyagaki *et al*, 2011; Jiang *et al*, 2011).

Tregolatorie (Treg). I linfociti Treg sono coinvolti nella regolazione delle risposte immunitarie e nel mantenimento della tolleranza al self. In base alla loro origine ed alla loro attività si distinguono in: cellule T regolatorie naturali (nTreg) e cellule T regolatorie inducibili (iTreg). Le nTreg originano nel timo, hanno un'alta espressione in membrana del recettore CD25 ed esprimono costantemente il fattore nucleare FoxP3 con cui esplicano attività immunosoppressoria (Nishikawa *et al*, 2010; Shevach, 2009; Miyara *et al*, 2011). Le iTreg originano a livello periferico da cellule T *naive* CD4<sup>+</sup> e mediano la soppressione immunitaria tramite la produzione del fattore di crescita trasformante (TGF- $\beta$ ) ed interleuchina 10 (IL-10) (Bergmann *et al*, 2008; Roncarolo *et al*, 2006). Disturbi che riducono la loro attività, possono comportare un aumento dell'immunità ad esempio contro i tumori e contro gli agenti di infezione cronica, mentre un loro incremento può causare una soppressione del sistema immunitario e questo è un dato da tenere in considerazione per il trattamento di malattie autoimmuni e nella prevenzione del rigetto dei trapianti.

2) I linfociti Tc (che rappresentano circa il 30% dei linfociti CD3<sup>+</sup>), una volta attivati, hanno la capacità di distruggere la cellula bersaglio attraverso tre meccanismi: i) tramite la secrezione di citochine citotossiche come IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ; ii) attraverso la secrezione di granuli citotossici, che liberano sostanze, come perforina o granzima, in grado di danneggiare la membrana della cellula bersaglio, causandone la lisi; iii) mediante il legame della molecola Fas ligando (espressa sulla superficie dei Tc in seguito alla

stimolazione) con il recettore Fas (CD95) espresso dalla cellula bersaglio, che innesca il processo apoptotico nella cellula presentante l'antigene.

Sono inoltre in grado di secernere citochine ed in base alla produzione di queste vengono suddivise, come i linfociti Th, in differenti sottopopolazioni.

❖ Nei **linfociti B**, il BCR è un'immunoglobulina capace di riconoscere direttamente l'antigene nella sua forma nativa senza necessità che sia complessato con le glicoproteine del complesso maggiore di istocompatibilità. È espresso in centinaia di copie ancorato alla membrana plasmatica ed è associato in modo non covalente a due molecole transmembranarie, chiamate Ig- $\alpha$  ed Ig- $\beta$ , necessarie per la trasduzione del segnale. Una volta avvenuto il riconoscimento antigenico, l'immunoglobulina costituente il BCR va incontro ad un cambiamento conformazionale che determina l'attivazione delle proteine Ig- $\alpha$  ed Ig- $\beta$ . Le proteine attivate inviano il segnale a livello nucleare, l'antigene viene internalizzato in un vacuolo all'interno del citoplasma, viene digerito e successivamente esposto sulle molecole MHC II presenti nella membrana. I peptidi antigenici espressi sull'MHC II vengono riconosciuti dai linfociti Th che, attivandosi, secernono citochine attivanti il linfocita B. Il linfocita B attivato prolifera e dà origine a cellule B che differenziano: in parte in plasmacellule secernenti anticorpi specifici per l'antigene iniziale, in parte in linfociti B della memoria.

### ***1.1.3 Interazione tra il microbiota intestinale e la risposta immunitaria***

Studi condotti su animali "germ free" (GF), dimostrano il coinvolgimento del MI nello sviluppo e nella modulazione della risposta immunitaria. Confrontando animali GF con "animali normali", si osservano differenze funzionali e morfologiche a livello gastrointestinale (come una ridotta motilità gastrointestinale, accumulo di muco, un'alterata architettura della mucosa intestinale) (Gustafsson *et al*, 1970; Abrams *et al*, 1967; Abrams *et al*, 1963), ma soprattutto, si osserva una carente maturazione del sistema immunitario ed una mancata polarizzazione delle risposte immunitarie specifiche (Zitvogel *et al*, 2016; Russell *et al*, 2010).

In dettaglio, la mancanza di microbiota intestinale porta ad alterazioni nello sviluppo del tessuto linfoide primario e secondario (GALT - Mosconi *et al*, 2013; Macpherson *et al*, 2004; Baptista *et al*, 2013, timo e milza - Bauer *et al*, 1963; Gordon *et al*, 1966) e ad avere un numero inferiore di cellule Th e di IgA che comportano una maggiore suscettibilità all'insorgenza delle infezioni (Gill *et al*, 2011).

Vista la forte influenza del MI sul SI, alterazioni a carico MI potrebbero contribuire alla patogenesi di malattie complesse come le malattie autoimmuni e le neoplasie (Wen *et al*, 2008; Vong *et al*, 2014; Iida *et al*, 2013; Thaiss *et al*, 2016) dove il SI è fortemente implicato.

### ***1.1.3.1 Microbiota intestinale ed immunità innata***

L'influenza del MI sull'immunità innata è stata evidenziata sulle cellule epiteliali intestinali (IEC), sulle cellule mieloidi e sulle cellule linfoidi innate (Petnicki-Ocwieja *et al*, 2009; Williams *et al*, 2006).

*Cellule epiteliali intestinali.* Le IEC, che comprendono enterociti, cellule globulari e cellule di Paneth, contribuiscono in modo significativo a numerose funzioni immunitarie (Peterson *et al*, 2014). Localizzate all'interfaccia tra il microbiota luminale ed il sistema immunitario, esplicano molteplici funzioni: forniscono una barriera fisica e biochimica; secernono mucine e peptidi antimicrobici; interagiscono con le cellule APC regolando il tipo di risposta immunitaria (Peterson *et al*, 2014); sono in grado di riconoscere molecole strutturalmente conservate (derivate da batteri, virus e parassiti) utilizzando recettori della famiglia dei recettori Toll-like (TLR) e recettori simili a domini di oligomerizzazione nucleotidici (Nod); sono in grado di rilevare la presenza di RNA grazie all'espressione di Rig-I (proteina citosolica del gene inducibile da acido retinoico -I) e Mda5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5); grazie all'espressione di NOD2 sulle cellule di Paneth, sono in grado di riconoscere il peptidoglicano microbico e di innescare la secrezione di citochine e l'espressione del gene antimicrobico (Couturier-Maillard *et al*, 2013; Girardin *et al*, 2003; Inohara *et al*, 2003). In assenza del MI, nei topi GF, le funzioni delle IEC risultano alterate: la produzione dei peptidi antimicrobici e delle citochine infiammatorie è compromessa (Cash *et al*, 2006; He *et al*, 2003); le cellule di Paneth mostrano una ridotta espressione di RegIII $\gamma$ , una lectina di tipo C che esercita un'attività antimicrobica su microbi Gram positivi (Cash *et al*, 2006); le cellule globulari mostrano una ridotta espressione di RELM $\beta$  (molecola simile alla resistina  $\beta$ ) (He *et al*, 2003), proteina in grado di regolare l'espressione di citochine infiammatorie da parte dei macrofagi (McVay *et al*, 2006). Infine, con la mancanza di microbiota, le IEC mostrano una ridotta espressione delle molecole MHC di classe II, molecole necessarie per la presentazione dell'antigene alle cellule T e dunque per l'attivazione di risposte adattative,

che possono essere ripristinate mediante colonizzazione batterica (Matsumoto *et al*, 1992).

*Cellule mieloidi innate.* La composizione del MI ed i suoi metaboliti (in particolare gli acidi grassi a catena corta, SCFA) influenzano la maturazione e le funzioni delle cellule mieloidi innate durante e dopo l'ematopoiesi (Khosravi *et al*, 2014; Trompette *et al*, 2014; Deshmukh *et al*, 2014; Gomez De Agüero *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2015; Hill *et al*, 2012). Studi condotti su topine gravide trattate con antibiotici, hanno evidenziato un numero di cellule mieloidi inferiore nella prole, e avvenuta l'ematopoiesi, un aumentato numero di basofili circolanti patogeni (Hill *et al*, 2012) e di neutrofili invecchiati (Zhang *et al*, 2015). L'influenza del MI e degli SCFA non si osserva soltanto sui basofili e neutrofili: ad essere modulati sono anche i macrofagi tissutali. Il MI ed i suoi metaboliti, vanno infatti a condizionare le funzioni immunologiche dei macrofagi tissutali e la loro interazione con i neuroni enterici (Chang *et al*, 2014; Muller *et al*, 2014; Fonseca *et al*, 2015).

*Cellule linfoidi innate.* Le cellule linfoidi innate sono cellule coinvolte nella regolazione delle risposte immunitarie e nell'omeostasi tissutale. A livello intestinale si trovano nella barriera e si distinguono in cellule NK, cellule induttrici del tessuto linfoide (LTI) ed in cellule linfoidi innate propriamente dette (ILC).

Le ILC si differenziano in tre sottoclassi: ILC1, ILC2, ILC3 che, a differenza degli altri linfociti, non presentano in membrana il recettore coinvolto nel riconoscimento antigenico ma si attivano in risposta a citochine.

Delle tre sottoclassi, ad oggi le più eterogenee e le più studiate sono le ILC3. Tali cellule si attivano in risposta all'interleuchina 23 (IL-23) ed IL-1 $\beta$ . Una volta attivate secernono IL-22 e sono coinvolte in molteplici processi: promuovono la maturazione del GALT; promuovono la produzione di IgA; contribuiscono alla difesa innata dell'ospite da agenti patogeni enterici; regolano l'omeostasi intestinale (Sonnenberg *et al*, 2015).

Per quanto riguarda il ruolo del MI nello sviluppo delle ILC3, sono presenti in letteratura dati contrastanti: ci sono studi che mostrano il normale sviluppo delle ILC3 in assenza di microbiota (Sawa *et al*, 2010; Reynders *et al*, 2011), ed allo stesso tempo, ci sono studi che mostrano la compromissione delle ILC3 in assenza di esso (Sanos *et al*, 2009; Satoh-Takayama *et al*, 2008). Ad essere invece chiaro, è il coinvolgimento del microbiota commensale dopo la linfopoiesi: il microbiota appare necessario per garantire il corretto funzionamento dell'LC3 (Sawa *et al*, 2011) e l'interazione con gli altri componenti del sistema immunitario (come le cellule mieloidi, le cellule T, le IEC). Ad esempio, i microbi

simbiotici promuovono un crosstalk tra macrofagi ed ILC3 necessario per l'induzione della tolleranza orale e dell'omeostasi immunitaria intestinale (Mortha *et al*, 2014).

### ***1.1.3.2 Microbiota intestinale ed immunità specifica***

Il coinvolgimento del MI nella regolazione dell'immunità adattativa è stato evidenziato nei topi GF dove, l'assenza del microbiota, genera alterazioni a carico dei linfociti B, dei linfociti T, dei linfociti intraepiteliali (IEL) e delle cellule natural killer T di tipo 1 (NKT1).

1) I linfociti B appaiono, negli animali GF, normali in numero ed in maturazione ma si riscontrano alterazioni nella produzione degli anticorpi IgA, IgG1, IgE: la produzione di IgA ed IgG1 risulta deficitaria mentre la produzione di IgE sieriche risulta aumentata (Crabbè PA *et al*, 1970; Cahenzli *et al*, 2013). Le alterazioni osservate, tornano nella normalità in seguito a colonizzazione microbica intestinale: il microbiota va ad agire sulla generazione e sulla maturazione del GALT (Cebra, 1999; Belkaid Y *et al*, 2014); sulle cellule dendritiche della lamina propria al fine di stimolare l'espressione delle molecole RA, BAFF, APRIL necessarie per lo sviluppo di cellule B produttrici IgA (Tezuka *et al*, 2007); sull'interazione tra linfociti B e T.

2) A riguardo dei linfociti T, in assenza di microbiota, si osserva una ridotta frequenza dei sottogruppi linfocitari (sia nei linfociti Th che nei Tc), dei linfociti intraepiteliali (IEL) che esprimono il TCR  $\alpha\beta$  ed una ridotta funzionalità dei IEL  $\gamma\delta$  (Umesaki *et al*, 1993; Bandeira *et al*, 1990; Ismail *et al*, 2009).

La ridotta frequenza dei sottogruppi linfocitari è legata alla mancata stimolazione da parte del microbiota dei Toll Like Receptors (stimolazione necessaria ad indurre la trascrizione di un'ampia varietà di mediatori infiammatori essenziali per regolare la polarizzazione dei linfociti T) (Karin *et al*, 2000; Feng *et al*, 2010; Kaisho *et al*, 2003); al mancato bilanciamento delle risposte sistemiche Th1/Th2 testimoniato dall'inclinazione verso risposte Th2 negli animali GF (Bowman *et al*, 2001; Mazmanian *et al*, 2005). Alcuni studi hanno dimostrato come le specie batteriche *Bacteroidetes fragilis* siano coinvolte nel bilanciamento Th1/Th2 osservato nei tessuti linfoidei non intestinali di GF topi (Sears *et al*, 2011) e nel sopprimere le risposte Th17 promuovendo le Treg attraverso il segnale TLR2 mentre batteri filamentosi segmentati (SFB) sono risultati potenti induttori delle cellule Th17 nella lamina propria intestinale (Ivanov *et al*, 2009);

A livello del colon, nei topi GF, si osserva inoltre un decremento dei Treg, decremento che viene annullato se ripristinata la colonizzazione microbica intestinale con varietà di microbi ed in particolare con le specie di *Clostridium*, di *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus murinus*, *Helicobacter hepaticus* e *Bacteroides fragilis* (Kullberg *et al*, 2002; Di Giacinto *et al*, 2005; Karimi *et al*, 2009; Atarashi *et al*, 2011; Shen *et al*, 2012; Atarashi *et al*, 2013; Furusawa *et al*, 2013; Narushima *et al*, 2014; Sefik *et al*, 2015; Tang *et al*, 2015).

3) A riguardo delle IEL, nei topi GF: i IEL CD8<sup>+</sup> appaiono compromessi nel numero e nella loro attività citotossica (Imaoka *et al*, 1996; Kawaguchi-Miyashita *et al*, 1996; Helgeland *et al*, 2004); i IEL  $\gamma\delta$ , che secernono chemochine e citochine coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi della mucosa in seguito a lesioni e nel controllo della penetrazione batterica attraverso le superfici danneggiate della mucosa, non riescono ad esplicare le loro funzioni (Yang *et al*, 2004; Ismail *et al*, 2009).

4) Le cellule NKTI, che sono coinvolte nel riconoscimento di antigeni glicolipidici presentati da CD1d (molecola non polimorfica simile alla classe MHC I) ed in numerose malattie immuno-correlate appaiono, nei topi GF, meno numerose ed iporesponsive alla stimolazione antigenica nei tessuti periferici, nella milza e nel fegato (Wingender *et al*, 2012) e più numerose ed iper-responsive nei tessuti della mucosa polmonare e del colon (Olszak *et al*, 2012; An *et al*, 2014). Attraverso la colonizzazione con batteri che esprimono antigeni per le NKT1, la iporespositività può essere normalizzata nei topi adulti ed amplificata durante i primi anni di vita (Wingender *et al*, 2012; Olszak *et al*, 2012; An *et al*, 2014).

### ***1.1.3.3 Microbiota ed immunosorveglianza nelle neoplasie***

Come precedentemente descritto, il microbiota è essenziale per modulare le risposte immunitarie, per mantenere l'omeostasi dei tessuti e per preservare lo stato di salute dell'uomo: una perturbazione della composizione del microbiota può interrompere questo ecosistema equilibrato determinando un'attivazione cronica ed anormale del sistema immunitario che spesso favorisce la crescita tumorale (Friedman *et al*, 2006; Rossini *et al*, 2006; Boursi *et al*, 2015).

Sempre più evidenze sostengono il ruolo del microbiota nella promozione dell'immunosorveglianza del cancro (Cheng *et al*, 2014; Sivan *et al*, 2015; Zitvogel *et al*,

2016): ad esempio, Sivan *et al.* hanno dimostrato la capacità delle specie commensali di *Bifidobacterium* di migliorare l'immunità antitumorale.

Secondo la teoria dell'immunosorveglianza (Figura 1), le cellule tumorali vengono riconosciute come "no self" dal sistema immunitario ed eliminate. Spesso accade, che alcune cellule trasformate, riescano però a sfuggire al controllo immunologico: quando questo accade, il sistema immunitario si attiva per impedire la crescita e l'espansione tumorale ma, durante questo processo, si ha una lenta perdita di immunogenicità nelle cellule trasformate che permette ad esse di eludere nuovamente i meccanismi immunitari e di dare così origine al tumore (Zitvogel *et al.*, 2006; Hanahan *et al.*, 2011; Schreiber *et al.*, 2011; Shankaran *et al.*, 2011).

In questo scenario, il microbiota locale e sistemico, vanno a contribuire all'immunosorveglianza:

**1)** innescando una risposta antitumorale attraverso mimetismo antigenico o attraverso la reattività crociata. Una forte evidenza di reattività crociata tra tumore e antigeni microbici che stimolano l'immunosorveglianza, è evidenziata da un recente studio condotto dal gruppo di Balachandran, il quale ha dimostrato, che i TAA (antigeni tumori associati) associati alla prognosi a lungo termine dei pazienti con carcinoma del pancreas sono paragonabili ai peptidi codificati dai patogeni infettivi piuttosto che agli antigeni relativi alle malattie autoimmuni o ai disturbi allergici (Balachandran *et al.*, 2017).

**2)** attivando le cellule T della lamina propria che possono migrare verso siti extra-intestinali seguendo i gradienti di chemochine generati dalla crescente massa tumorale (Cheng *et al.*, 2014; Wilson *et al.*, 2015; Jacquelot *et al.*, 2016);

**3)** innescando una risposta immunitaria al di fuori della sede intestinale: il microbiota oltrepassa la mucosa e raggiunge i linfonodi mesenterici o altre sedi. In sede extra-intestinale attiva la risposta linfocitaria. In alcuni casi, non si ha il traslocamento del microbiota ma, a migrare verso i linfonodi drenanti e ad attivare i linfociti T, sono cellule dendritiche che hanno legato le proteine microbiche: ad esempio, studi condotti su topi, hanno mostrato che cellule dendritiche presentanti LPS microbici attivano linfociti Tc self/tumore-specifici portando ad una maggiore regressione del tumore, tramite attivazione TRL4 mediata (Paulos *et al.*, 2007);

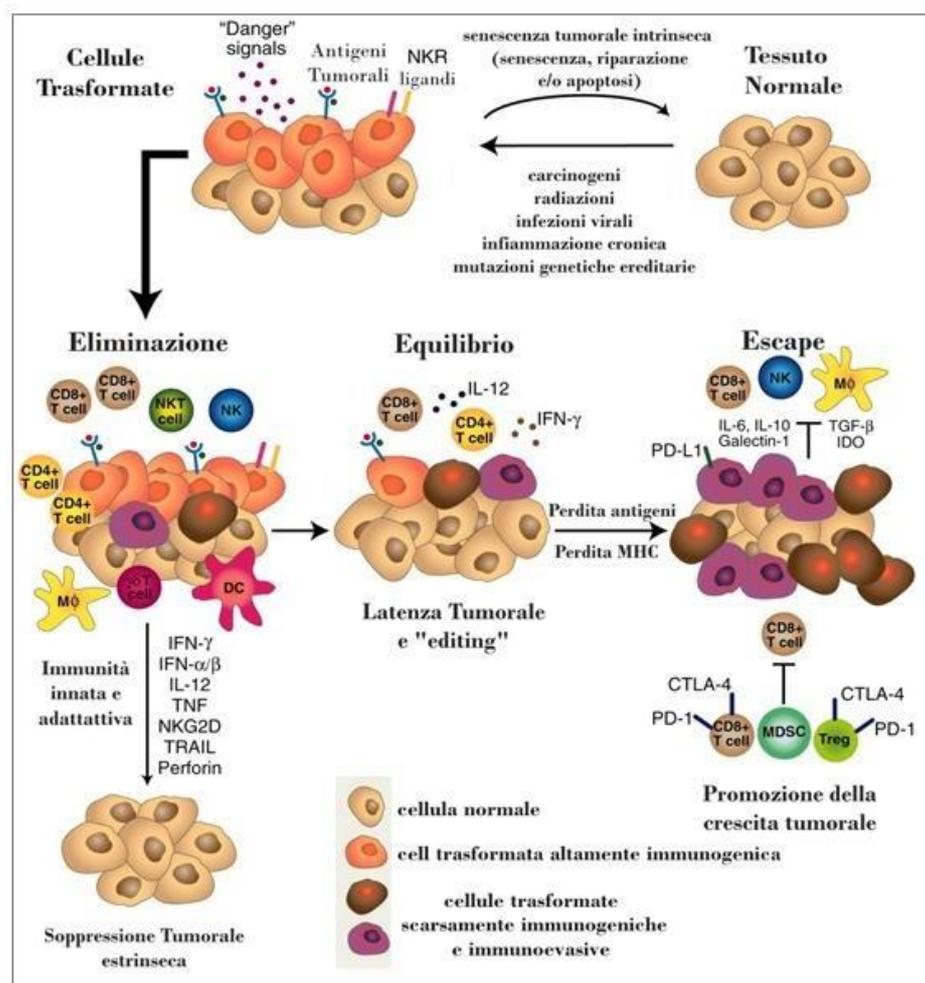
**4)** stimolando la produzione di citochine (e altri mediatori immunitari) che vanno a montare risposte linfocitarie diverse (di tipo Th1/Tc1, Th2/Tc2, Th17/Tc17 o Treg) che hanno effetti diversi nei confronti della crescita neoplastica (Coussens *et al.*, 2013; Niccolai *et al.*, 2017).

Per quanto concerne il ruolo delle singole sottoclassi linfocitarie nell'immunosorveglianza, abbiamo che:

- I linfociti Th1/Tc1, attraverso la produzione di IFN- $\gamma$ , esplicano un ruolo anti-tumorale: IFN- $\gamma$  attiva le cellule dendritiche presenti in sede tumorale, le cellule NK ed macrofagi di tipo I che vanno ad eliminare le cellule trasformate (Quezada *et al*, 2010; Palucka *et al*, 2012; Corthay *et al*, 2005); IFN- $\gamma$  sostiene lo sviluppo di cellule Th1 inibendo lo sviluppo di linee Th2 potenzialmente protumorali; promuove l'espressione del recettore chemochinico CXCR3 e dei suoi ligandi CXCL9, CXCL10 e CXCL11 che attraggono le cellule Th1 nel sito tumorale infiammatorio (Rotondi *et al*, 2003); inibisce lo sviluppo e l'attivazione delle cellule T regolatorie (Treg) (Nishikawa *et al*, 2005; Caretto *et al* 2010); up-regola l'espressione di molecole MHC da parte di cellule tumorali facilitandone il riconoscimento e l'eliminazione da parte dei CTL; inibisce la proliferazione delle cellule cancerose (Zaidi *et al*, 2011); promuove l'apoptosi delle cellule tumorali stimolando l'espressione di caspasi, Fas e TRAIL (Takeda *et al*, 2002; Chin *et al*, 1997; Xu *et al*, 1998; Meng *et al*, 2001); inibisce l'angiogenesi nel microambiente tumorale (Beatty *et al*, 2001).
- il loro ruolo dei Th2/Tc2 in ambito tumorale è ancora poco chiaro: ci sono studi che suggeriscono il ruolo dei Th2 nel sostenere la carcinogenesi e la progressione tumorale (Ochi *et al*, 2012; Tatsumi *et al*, 2002) e studi che mostrano l'esistenza di Th2 produttori principalmente interleuchina-24 (IL-24) che sembrano spiegare una funzione inibitoria nei confronti della crescita neoplastica (Emdad *et al*, 2009; Dash *et al*, 2010; Ouyang *et al*, 2011).
- Il ruolo dei Th17/Tc17 nell'immunità dei tumori è molto controverso: secondo alcuni studi le cellule secernenti IL-17 avrebbero un ruolo pro-tumorale essendo implicate nella promozione e nello sviluppo dei tumori nel contesto di stati infiammatori cronici (Wu *et al*, 2009; Wang *et al*, 2009) e nella promozione della neoangiogenesi tumorale, inducendo il rilascio di mediatori angiogenetici come VEGF (vascular endothelial growth factor) e chemochine quali CXCL1, CXCL5, CXCL6 e CXCL8, da parte delle cellule tumorali, di quelle endoteliali e di quelle stromali (Numasaki *et al*, 2003; Takahashi *et al*, 2005; Lee *et al*, 2008). In contrasto, ci sono prove a sostegno del ruolo protettivo svolto dalle Th17: studi clinici condotti su pazienti con cancro ovarico avanzato mostrano una correlazione positiva tra il numero di linfociti Th17, la concentrazione di IL-17 a livello

intratumorale e la sopravvivenza dei pazienti (Wilke *et al*, 2011; Kryczek *et al*, 2009; Niccolai *et al*, 2016).

- Le risposte T regolatorie, nel contesto delle risposte immunitarie ai tumori, svolgono un ruolo pro-tumorale: l'IL-10 va ad inibire le cellule T effettrici (Taga *et al*, 1993) e le cellule dell'immunità innata. Ad esempio, a livello delle APC, IL-10 inibisce l'espressione di molecole costimolatorie, come quelle appartenenti alla famiglia B7 (Vicari *et al*, 2004; O'Garra *et al*, 2009), regola negativamente la produzione di IL-12 ed inibisce la maturazione e la differenziazione delle DC (Moore *et al*, 2001). Inoltre, è stato dimostrato come le cellule Treg producenti IL-10 siano responsabili di una tolleranza immunitaria periferica dovuta alla scarsa attivazione e regolazione dei CTL, dei Th1 e di altre cellule T effettrici, che facilita i meccanismi di escape tumorale e la crescita della massa neoplastica (Seo *et al*, 2002).



**Figura 1.** Teoria dell'immunosorveglianza

#### **1.1.3.4 Microbiota ed autoimmunità**

Gli studi condotti sugli animali GF, hanno mostrato un'associazione tra disbiosi intestinale, infiammazione cronica e malattie autoimmuni che suggerisce un ruolo patogeno del microbiota nello sviluppo dell'autoimmunità (Round *et al*, 2010) ed inoltre, hanno fatto emergere un'influenza del microbiota sullo stato ormonale e sulla prevalenza del genere femminile nelle malattie autoimmuni (Markle *et al*, 2013; Yurkovetskiy *et al*, 2013).

Alterazioni della composizione e della funzione del microbiota intestinale, associate alla perdita di integrità della barriera intestinale ed ad infiammazione, sono state osservate in varie malattie autoimmuni (nel diabete di tipo 1, nella sclerosi multipla, nel lupus eritematoso sistemico, nell'artrite reumatoide) ed hanno rafforzato l'ipotesi del coinvolgimento del microbiota nelle patologie autoimmunitarie (Wu *et al*, 2012; Bhargava *et al*, 2014; Hevia *et al*, 2014; Hu *et al*, 2015; Li *et al*, 2015; Rosser *et al*, 2016; Lopez *et al*, 2016; Maeda *et al*, 2016; Chen *et al*, 2016).

Ad oggi, i meccanismi che spiegano il ruolo del microbiota nelle malattie autoimmuni devono essere ancora completamente chiariti, ma ad essere coinvolti sembrano: i) il mimetismo molecolare (Westall, 2006; Blank *et al*, 2007); ii) l'attivazione delle cellule T dell'ospite (Horwitz *et al*, 1998); iii) la diffusione dell'epitopo (Miller *et al*, 1997); iv) le modificazioni post-traduzionali delle proteine luminali da parte di enzimi microbici, che a loro volta inducono la generazione di epitopi immunogeni innescando l'autoimmunità (Lerner *et al*, 2016).

La teoria del mimetismo molecolare si basa sulla somiglianza di alcuni epitopi microbici con componenti dell'organismo ospite: gli epitopi microbici vengono, per la somiglianza con gli antigeni "self", tollerati dal sistema immunitario ma se, fattori genetici e fattori ambientali vanno ad alterare il meccanismo di tolleranza immunologica, il sistema immunitario non è più in grado di distinguere gli antigeni "self" dai "non self", si attiva e li attacca entrambe generando un danno. Quando il danno è a carico della barriera intestinale, si possono generare malattie autoimmunitarie che interessano la sede del danno ma anche malattie sistemiche: il danno mucosale permette la diffusione dell'epitopo in altre sedi con conseguente stimolazione di reazioni immunitarie distanti dal danno di origine.

## ***1.2 Carcinoma Coloretale***

Il carcinoma coloretale (CRC), tra le forme tumorali, rappresenta nel mondo la terza neoplasia in termini di incidenza e la seconda in termini di mortalità (Bray *et al*, 2018). È una neoplasia che origina da una proliferazione incontrollata delle cellule della mucosa intestinale ed insorge nel 70% dei casi a livello del colon mentre nel 30% dei casi a livello del retto.

Spesso si sviluppa a partire da polipi intestinali neoplastici di natura benigna (polipi adenomatosi) che, restando asintomatici per anni, non vengono precocemente individuati e vanno incontro nel tempo ad un aumento del grado di displasia fino a degenerare in formazioni cancerose maligne.

Nel mondo, costituisce una delle maggiori cause di morte per cancro: nel 2018 a livello mondiale sono stati stimati 1,8 milioni di nuovi casi con un numero di decessi pari a 881.000 (Bray *et al*, 2018); in Italia sono stati stimati 51.300 nuovi casi e, dati relativi alla mortalità del 2015, indicano un numero di decessi pari a 18.935 (AIOM, 2018).

Nonostante l'incidenza e la mortalità per CRC siano elevate, i loro tassi risultano in diminuzione probabilmente grazie al monitoraggio dei fattori di rischio ed alla diffusione dei servizi di screening oncologico. Si manifesta prevalentemente tra i 60 e 75 anni ed il sesso maggiormente colpito è quello maschile: l'incidenza è in rapporto 1,4:1 negli uomini rispetto alle donne.

Riguardo le aree maggiormente interessate, le nazioni dove si registrano i più alti tassi di incidenza sono paesi dell'Europa (Ungheria, Slovenia, Slovacchia, Paesi Bassi, Norvegia), Australia/Nuova Zelanda, Nord America, Asia Orientale (Giappone, Korea, Singapore) mentre, i più bassi tassi di incidenza si riscontrano in Africa e in Asia del Sud (Bray *et al*, 2018).

### ***1.2.1 Eziologia***

Fattori ambientali. Un regime alimentare scorretto, uno stile di vita sedentario, l'obesità, il consumo eccessivo di alcool, l'abitudine al fumo, sono tutti considerati fattori di rischio per lo sviluppo del CRC.

- *L'alimentazione.* Una dieta ricca di grassi e proteine animali, povera di fibre e di micronutrienti protettivi, contribuisce ad un aumento della probabilità di sviluppare il CRC (Willett, 2005). Fra gli alimenti, uno dei rischi maggiori per lo sviluppo del CRC, è legato ad un errato consumo di carni rosse e carni processate e ad un elevato consumo

di grassi. A riguardo dei grassi, l'eccessivo consumo di essi, aumenta la sintesi epatica di colesterolo e di acidi biliari che possono essere convertiti dalla flora intestinale in cancerogeni. Per le carni, invece, la pericolosità legata ad un eccessivo consumo, deriva dal fatto che essi contengono elementi (grassi saturi, ferro biodisponibile nel gruppo eme dell'emoglobina e della mioglobina, nitriti e nitrati) che possono dar luogo alla formazione di nitrosamine cancerogene a livello intestinale (Bastide *et al*, 2011). Inoltre, ad influire sulla pericolosità della carne, sono le modalità ed i tempi di cottura in quanto, se errati, determinano la formazione di ammine aromatiche ed idrocarburi policiclici aromatici cancerosi (Santarelli *et al*, 2008). L'eccessivo consumo di carne e di alimenti ricchi di grassi non è però l'unico punto su cui fare attenzione: le fibre vegetali, gli alimenti ricchi di calcio e di vitamina D sono alimenti importanti per un corretto regime alimentare. Un basso consumo di fibre vegetali determina un allungamento del tempo di transito delle feci a livello intestinale ed un'alterazione della flora batterica. Tali fenomeni determinano l'aumento della concentrazione e del tempo di permanenza, a livello della mucosa intestinale, dei prodotti di degradazione dei carboidrati raffinati (prodotti potenzialmente tossici). L'assunzione di 1000 IU/giorno di vitamina D può ridurre il rischio di CRC fino al 50%, e l'assunzione di 1250 mg/giorno di calcio può anch'essa ridurre significativamente il rischio di CRC (Gorham *et al*, 2005). La protezione data dal calcio è legata alla decelerazione, provocata dal calcio stesso, della proliferazione delle cellule epiteliali del colon ed alla neutralizzazione degli acidi biliari (Gorham *et al*, 2005).

- *L'obesità.* Un indice di massa corporea (BMI) troppo elevato può rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo del CRC. L'obesità, così come la sedentarietà, può portare allo sviluppo di patologie cardiovascolari e diabete di tipo 2 (Frezza *et al*, 2006). Queste patologie possono essere accompagnate da iper-insulinemia e da un'elevata secrezione di citochine pro-infiammatorie responsabili di gravi infiammazioni croniche del colonretto. L'iper-insulinemia accresce il rischio di sviluppo del CRC attraverso la promozione della proliferazione cellulare a livello del colon e la riduzione dell'apoptosi (Marley *et al*, 2016).

- *Il fumo e l'alcool.* La capacità del tratto gastrointestinale e del sistema circolatorio di diffondere le sostanze cancerogene alla mucosa colon-rettale (aumentando il rischio di infiammazione, mutagenesi e carcinogenesi), fa sì che il fumo sia considerato fattore di rischio per l'insorgenza di CRC (Harris, 2015). Il fumo di tabacco può incrementare fino al 10,8% la probabilità di insorgenza del CRC (Botteri *et al*, 2008; Cross *et al*, 2014).

Il rischio correlato all'alcool è dovuto alle conseguenze che questo apporta alla normale sintesi dei folati: l'alcool che arriva a livello del colon viene metabolizzato in acetaldeide, la quale degrada il folato. Dal momento che il folato è richiesto per la sintesi e la riparazione del DNA, la sua mancanza conduce a squilibri cellulari, che possono contribuire alla carcinogenesi (Harris, 2015). È stato dimostrato che il consumo giornaliero di 2-3 Unità Alcoliche (U.A.) aumenta del 20% il rischio di sviluppare il CRC (Fedirko *et al*, 2011).

- *L'inflammatione cronica.* La colite ulcerosa ed il morbo di Chron rappresentano un importante fattore di rischio per lo sviluppo di CRC (Yashiro, 2014; Harris, 2015). Entrambe le patologie sono caratterizzate da uno stato di infiammazione cronica a livello intestinale. Il carico infiammatorio a livello intestinale, se non trattato, può favorire lo sviluppo di neoplasie. Individui con lunga storia di colite cronica ulcerosa presentano, infatti, un aumentato rischio del 3,7% di sviluppare il CRC (Eaden *et al*, 2001), mentre le persone che soffrono di Crohn hanno un rischio del 2,5% più elevato di sviluppare il CRC (Canavan *et al*, 2006).
- *I microrganismi.* Il *Fusobacterium nucleatum*, batterio che popola principalmente il cavo orale dove è responsabile di gengiviti e periodontiti, si riscontra a livello del colon in numerosi pazienti con CRC. Sembra promuovere la progressione del CRC con due meccanismi di azione: 1) inducendo la proliferazione delle cellule epiteliali determinando un microambiente proinfiammatorio che favorisce la proliferazione cellulare, la disseminazione delle cellule neoplastiche, l'aggressività tumorale (Rubinstein *et al*, 2013); 2) producendo la lectina Fap2 che è in grado di bloccare l'attività antitumorale citotossica delle cellule T e NK (Mima *et al*, 2015; Gur *et al*, 2015).

Fattori genetici. Una percentuale molto bassa di casi di CRC (3%) è da attribuire a sindromi ereditarie come: la sindrome di Lynch, la sindrome polipo adenomatosa familiare (FAP) e la poliposi MUTYH-associata (MAP).

- *La sindrome di Lynch (HNPCC):* è una sindrome ereditaria autosomica dominante causata da una mutazione dei geni mismatch repair (MMR). Tali geni sono responsabili della riparazione dei difetti di appaiamento del DNA e comprendono: il gene MLH1; MSH2; EPCAM; MSH6 o PMS2. Il CRC nei pazienti affetti da questa sindrome risulta essere caratterizzato da una carcinogenesi accelerata, probabilmente causata dal coinvolgimento secondario di oncogeni e di geni soppressori tumorali che vengono mutati proprio a causa della mancanza funzionale dei geni MMR (Vasen *et al*, 2015).

- *La poliposi adenomatosa familiare (FAP):* è una sindrome a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da comparsa di centinaia o migliaia di adenomi a livello del colon e del retto. Si sviluppa generalmente nella seconda decade di vita e per anni resta asintomatica. È dovuta ad una mutazione a carico del gene Adenomatous Polyposis Coli (APC): la mutazione determina un accumulo di  $\beta$ -catenine che porta all'attivazione trascrizionale di geni ed oncogeni correlati alla crescita ed alla divisione cellulare. La continua divisione cellulare determina lo sviluppo di adenomi colon-rettali che, in mancanza di un trattamento tempestivo, possono evolvere in carcinomi entro dieci anni (Vasen *et al*, 2015).
- *La poliposi MUTYH-associata (MAP):* è una sindrome caratterizzata dalla comparsa di numerosi polipi adenomatosi a livello del colon retto che possono evolvere in carcinoma. È clinicamente molto simile alla FAP ma differenzia da essa per la concomitanza di polipi adenomatosi con polipi di tipo serrato ed iperplastici; per la trasmissione autosomica recessiva. È causata da mutazioni a carico del gene MUTYH, gene codificante una glicosilasi coinvolta nella riparazione di una delle forme più frequenti e stabili di danno ossidativo, vale a dire l'ossidazione di una guanina che porta alla formazione di 8-oxo-7, 8-diidro-2'-deossiguanosina (8-oxoG). Pazienti con tale sindrome tendono a sviluppare CRC ad un'età media di 50 anni (Farrington *et al*, 2004; Out *et al*, 2010) e la massa tumorale ha caratteristiche che la differenziano dai tumori sporadici: hanno una posizione prossimale preferenziale, un componente mucinoso ed una maggiore presenza di linfociti infiltranti il tumore (van Puijenbroek *et al*, 2008).

### ***1.2.2 Prevenzione del carcinoma coloretale***

La prevenzione, nel caso del tumore coloretale, mira a correggere ed eliminare i fattori di rischio e ad individuare la presenza di lesioni precancerose che possono negli anni evolvere in neoplastiche. Le lesioni precancerose nel tempo tendono a sanguinare e, sporgendo dalla mucosa intestinale, sono ben visibili con l'esame endoscopico.

Ad oggi, per il CRC, i mezzi di screening maggiormente utilizzati sono:

- *La ricerca del sangue occulto nelle feci:* è un esame raccomandato alle persone di età compresa tra 50 e 69 anni e da eseguire ogni due anni. Non è un test diagnostico ma, se positivo, fa sospettare la presenza di una lesione. Consiste nella raccolta di un piccolo campione di feci al fine di ricercare tracce di sangue non visibili a occhio nudo. La presenza del sangue nelle feci viene individuata attraverso test immunologici che

sfruttano anticorpi diretti contro la globina dell'emoglobina umana (Van Rossum *et al*, 2008). Studi svolti su un totale di 400 000 soggetti hanno dimostrato che il test sulla ricerca del sangue occulto, svolto con scadenza regolare, riduce la mortalità per CCR di circa il 33% (AIOM, 2017);

- *Retto-sigmoidoscopia*: viene eseguita tramite una sottile sonda flessibile dotata di telecamera che permette di visualizzare lesioni a livello del sigma e del retto;
- *Colon-scopia*: è un esame diagnostico ed un potente strumento di prevenzione. Viene svolto per approfondimento in caso di positività all'esame del sangue occulto nelle feci o alla retto-sigmoidoscopia. È un esame invasivo ma permette di visualizzare tutto il colon-retto e, nel caso si riscontri la presenza di lesioni precancerose di piccole dimensioni, permette l'immediata asportazione di esse.

### ***1.2.3 Patogenesi***

Il processo di cancerogenesi del CRC è un processo multi-step che vede coinvolte numerose alterazioni genetiche. Attualmente, si ritiene che possa avvenire attraverso tre vie di sviluppo distinte:

#### *1) Via dell'APC/ $\beta$ catenina*

È caratterizzata da instabilità cromosomica che determina il graduale accumulo di mutazioni a livello di oncogeni e di geni oncosoppressori. Il primo gene ad essere coinvolto è il gene oncosoppressore APC: il gene APC viene perso e questo provoca un'adesione cellulare deficitaria ed un'eccessiva attività proliferativa che portano alla formazione di piccoli adenomi a livello dell'epitelio intestinale. Alla perdita di APC segue il coinvolgimento dell'oncogene K-RAS: la mutazione a carico di K-RAS determina la produzione di una proteina K-RAS anomala che stimola in modo continuo la crescita cellulare. Ulteriori mutazioni si verificano a carico del gene oncosoppressore p53, dei geni SMAD2 e SMAD4: l'inattivazione di tali geni ha effetto oncogeno a livello intestinale e si arriva ad avere l'insorgenza del carcinoma. Nel carcinoma le cellule presentano aumentata attività telomerica che determina stabilità cromosomica e immortalità cellulare (Kumar *et al*, 2006);

#### *2) Via dell'instabilità dei microsatelliti*

I microsatelliti sono brevi sequenze ripetute del DNA presenti normalmente nel genoma umano. A seguito di specifiche mutazioni, i microsatelliti possono variare nel numero di ripetizioni rendendo in tal modo il DNA instabile. Nel 15% dei casi di CRC sporadici e

nel 95% dei casi di Sindrome di Lynch si ha instabilità dei microsatelliti legata ad alterazioni a carico dei geni coinvolti nella riparazione degli errori di appaiamento del DNA. I geni coinvolti sono tanti ed è la loro inattivazione a determinare la formazione della massa tumorale (Kumar *et al*, 2006);

### 3) *Metilazione aberrante del DNA*

La metilazione è un meccanismo epigenetico che regola la trascrizione genica. Le sequenze promotrici del DNA, se metilate, non vengono trascritte in quanto, la metilazione, va ad alterare la capacità dei fattori trascrizionali di legarsi ad esse. Frequentemente alla base di CRC c'è un processo di iper-metilazione a livello di geni oncosoppressori che determina il silenziamento trascrizionale di essi favorendo la crescita neoplastica (Kumar *et al*, 2006).

## ***1.2.4 Manifestazioni cliniche e prognosi***

Nella maggioranza dei casi, il CRC nello stadio iniziale resta asintomatico e, nei pochi casi in cui dà sintomi, la sintomatologia è aspecifica.

Con la progressione della malattia, i sintomi diventano evidenti e variano a seconda della sede anatomica interessata.

Quando la sede colpita è il colon destro, il quadro clinico è aspecifico e per questo spesso sottovalutato. Inizialmente i sintomi che si riscontrano sono: dolore addominale, astenia, anoressia, dispepsia e, solo con il progredire della malattia, si ha una condizione di anemia da sangue occulto e sanguinamento.

Nei carcinomi del colon sinistro, la sintomatologia è più chiara e questo comporta una diagnosi precoce anche se non correlata ad una prognosi migliore in quanto tumori più infiltranti rispetto ai tumori che interessano il colon destro. I sintomi, in questo caso, comprendono la presenza di sangue occulto nelle feci, alterazioni dell'alvo che determinano diarrea o stitichezza, dolori crampiformi al quadrante addominale inferiore di sinistra.

Sia nel caso di carcinomi del colon destro che sinistro, le manifestazioni sistemiche quali astenia, malessere e perdita di peso, sono da considerarsi preoccupanti in quanto di solito sono indici di uno stato avanzato di malattia.

Tutti i tumori del colon-retto possono diffondere per estensione diretta alle strutture adiacenti e dare metastasi per via linfatica ed ematica: le sedi metastatiche del CRC sono prevalentemente i linfonodi regionali, il fegato, i polmoni e le ossa.

La prognosi nei soggetti con cancro del colon-retto dipende strettamente dal grado di invasione tissutale locale, dall'infiltrazione degli organi vicini e dalla presenza di metastasi linfonodali o ad altri organi. Il sistema di stadiazione che tiene conto dei tre parametri sopra indicati è il sistema TNM. Il sistema TNM, si basa infatti sul grado di infiltrazione del tumore (T); sulla presenza di linfonodi interessati (N) e, per ultimo, sulla presenza di metastasi (M) (Golato *et al*, 2016; Greene *et al*, 2004). Il riconoscimento della lesione tumorale nel primo stadio della malattia (tumore a livello della sottomucosa o muscolare propria senza interessamento dei linfonodi ne metastasi a distanza) consente una sopravvivenza a 5 anni dopo resezione chirurgica di circa il 90%; nel secondo stadio della malattia (assenza di interessamento linfonodale e metastasi a distanza ma interessamento degli organi adiacenti) del 70-80%; nel terzo stadio (tumore invasivo con interessamento linfonodale e/o metastasi a distanza) del 40-65%.

### ***1.2.5 Terapia***

Attualmente la resezione chirurgica è il trattamento elettivo per il CRC e, grazie ai sistemi di screening che permettono una diagnosi precoce, circa l'80% dei pazienti si presenta con malattia operabile radicalmente. Nonostante la percentuale di pazienti operabili sia elevata, restano da non sottovalutare le recidive nei 3 anni successivi all'intervento. A livello locale sono rare le recidive ma frequenti sedi di ripresa della malattia sono i linfonodi addominali, il fegato, i polmoni ed il peritoneo.

A seguito del solo intervento chirurgico, nei pazienti con CRC allo stadio I e II non è indicato il trattamento farmacologico ma, in tutti i pazienti che presentano interessamento linfonodale, viene effettuato un trattamento chemioterapico adiuvante mirato a rimuovere eventuali cellule tumorali residue ed a ridurre la probabilità di sviluppare nuovamente la malattia: nei pazienti sottoposti al trattamento si osserva una riduzione del rischio relativo di morte del 33% (Sargent *et al*, 2009). Il trattamento chemioterapico, nei pazienti in cui la massa tumorale è troppo estesa per essere direttamente asportata, può essere effettuato prima dell'intervento chirurgico (in tal caso si parla di terapia neo-adiuvante) al fine di ridurre la massa neoplastica. In tali pazienti, in alternativa alla chemioterapia adiuvante, può essere fatta la radioterapia adiuvante.

A riguardo della chemioterapia, il farmaco maggiormente utilizzato nei pazienti con CRC è il 5-fluorouracile (5-FU) associato con acido folinico ed oxaliplatino oppure 5-FU associato con capecitabina ed oxaliplatino.

Oltre ai farmaci chemioterapici, sono oggi disponibili farmaci biologici: anticorpi monoclonali che vanno a legarsi in modo specifico a molecole presenti sulla membrana delle cellule tumorali senza danneggiare le cellule sane dell'individuo. Il meccanismo di azione di questi farmaci è vantaggioso per il paziente ma, purtroppo non sempre attuabile in quanto è necessario conoscere i bersagli molecolari su cui agire. I farmaci biologici utilizzati sono Bevacizumab (che si lega al fattore di crescita endoteliale vascolare A, impedendone l'interazione con i suoi recettori portando alla regressione dei vasi sanguigni tumorali esistenti, alla normalizzazione dei vasi sanguigni rimanenti e, conseguentemente, ad un'inibizione del tumore) e Cetuximab (si lega al fattore di crescita dell'epidermide). Studi clinici hanno dimostrato che la terapia con Bevacizumab associato alla chemioterapia standard prolunga la sopravvivenza in pazienti con CRC metastatico (Kramer *et al*, 2007); che la terapia con Cetuximab associato alla chemioterapia standard porta benefici nei pazienti con CRC avanzato o metastatico in cui le cellule tumorali risultavano positive per EGFR (Venook *et al*, 2017).

### ***1.3 Celiachia***

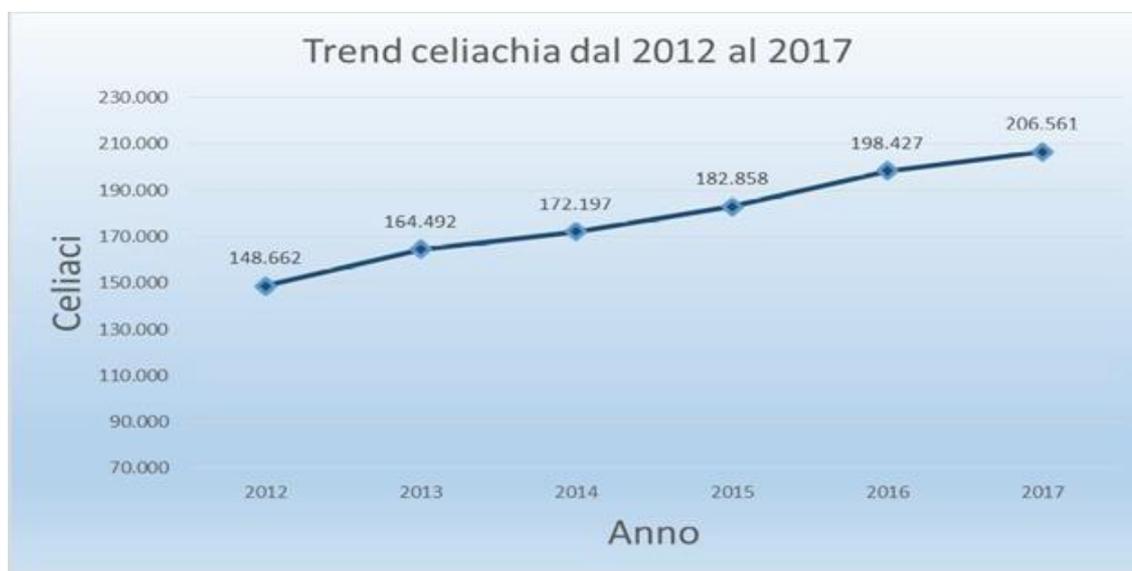
La malattia celiaca (MC) è un'enteropatia cronica immuno-mediata causata dall'ingestione di glutine in soggetti geneticamente predisposti

Nonostante il glutine e la predisposizione genetica, che vede coinvolti i geni DQ2 e/o DQ8 legati al sistema maggiore di istocompatibilità HLA, siano elementi necessari per lo sviluppo della MC, da soli non sono sufficienti per generarla. Infatti, il 30% della popolazione presenta i geni predisponenti ma soltanto nel 3% di loro insorge la malattia: tale dato genera l'ipotesi di un quadro patologico multifattoriale complesso alla base della celiachia (Caio *et al*, 2019; Mazzilli *et al*, 1992).

MC è una patologia che si sviluppa sia nei bambini che negli adulti ed insorge più frequentemente nel genere femminile rispetto al genere maschile: la proporzione media è di 1 maschio:2 femmine (Relazione annuale al Parlamento sulla celiachia, 2017).

Colpisce lo 0,5-1% della popolazione generale su scala nazionale e mondiale. Sulla prevalenza dello 0,5-1% fanno eccezione le aree dell'Africa Sub-Sahariana e del Giappone dove, essendo bassa la frequenza dei geni predisponenti ed il consumo dei cereali contenenti glutine, è bassa la prevalenza della malattia (Caio *et al*, 2019; Corazza *et al*, 1997; Ivarsson *et al*, 1999; Riestra *et al*, 2000; Volta *et al*, 2001; Mustalahti *et al*, 2010; Rubio-Tapia *et al*, 2012; Singh *et al*, 2016).

A riguardo della situazione italiana, dati epidemiologici relativi al 2017, indicano la presenza di 206.561 (145.759 femmine e 60.802 maschi) celiaci diagnosticati, numero in aumento rispetto agli anni precedenti (Relazione annuale al Parlamento sulla celiachia, 2017). Dal 2012 al 2017 sono state registrate 57.899 nuove diagnosi con una media di circa 10.000 nuove diagnosi all'anno (Figura 2). In particolare, se consideriamo gli ultimi anni, nel 2016 ci sono state 15.569 diagnosi di celiachia in più rispetto all'anno precedente e nel 2017 ce ne sono state 8.134 in più rispetto al 2016. L'aumento del numero dei pazienti celiaci potrebbe far pensare a cambiamenti forti da parte della popolazione durante il corso degli anni: in realtà l'aumento è semplicemente legato ai progressi fatti nella diagnosi di questa patologia che permettono di riconoscere e di fare più attenzione ai sintomi dell'intolleranza al glutine.



**Figura 2.** Trend della celiachia in Italia dal 2012 al 2017.

### 1.3.1 Eziologia

Tra i vari fattori eziologici annoveriamo:

- *Il glutine.* Il glutine è la frazione proteica alcol-solubile di grano, orzo e segale. È costituito da gluteline e prolammine. Del glutine, ad essere dannose per i pazienti celiaci, sono le prolammine che, nei pazienti, innescano una risposta immune a livello intestinale che genera infiammazione cronica e danno tissutale.
- *Predisposizione genetica.* Ad essere indubbiamente coinvolti nella predisposizione alla malattia celiachia sono i geni DQ2 e/o DQ8 dei loci genici DQA e DQB dell'HLA di classe II. Il legame tra HLA-DQ2, HLA-DQ8 e glutine è legato al fatto che le gliadine del glutine hanno un'elevata affinità per alcuni siti di legame presenti sulle molecole DQ2 e DQ8 espresse sulla membrana delle cellule che presentano l'antigene ai linfociti T (Trynka *et al*, 2010; Qiao *et al*, 2009; Koning, 2012). Tra i celiaci, il genotipo DQ2 è il più diffuso (si riscontra in più dell'80% dei celiaci) e identifica il gene DQB1\*02 associato in posizione cis o trans al gene DQA1\*05; il genotipo DQ8 identifica il gene DQA1\*03 associato a DQB1\*03:02 ed è presente nel 10% dei celiaci; infine, il 5% dei celiaci è DQB1\*02 positivo ma DQA1\*05 negativo (Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana AIC, 2015). Il coinvolgimento genetico determina un aumento del rischio di sviluppare la celiachia nei familiari di pazienti celiaci rispetto alla popolazione generale: nei familiari di I° grado dei pazienti celiaci il rischio è aumentato del 10-15%; tra gemelli monozigoti del 75-80% (Lundin *et al*, 2015).

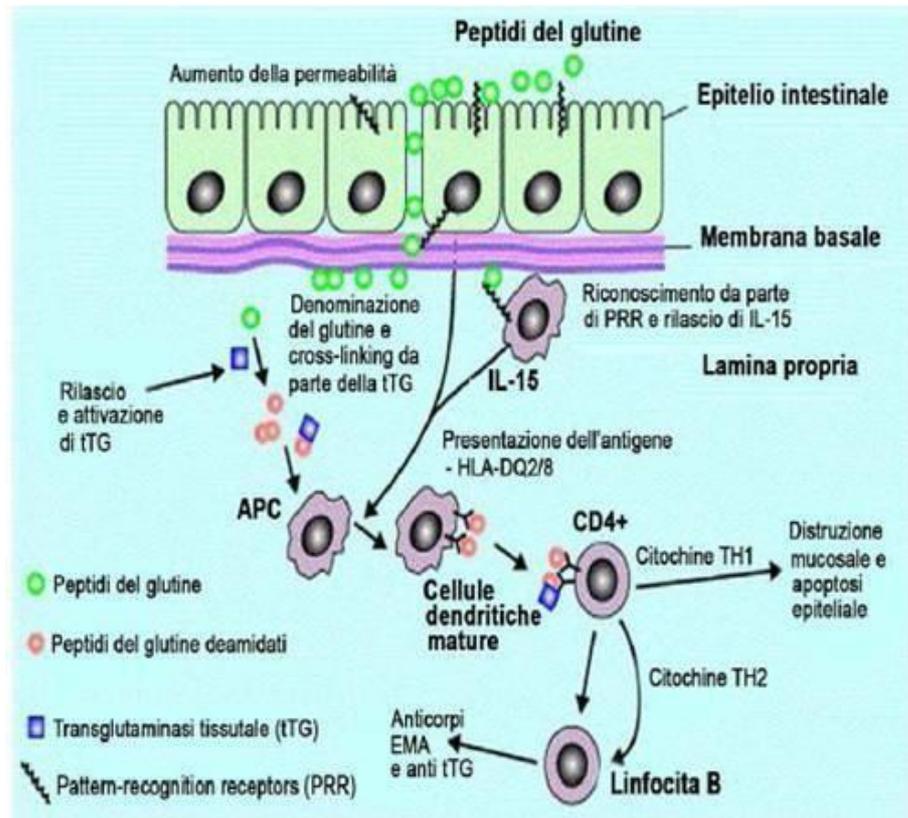
Oltre ai geni del sistema HLA, sembrano essere coinvolti nell'aumento del rischio di sviluppare la celiachia, più di 100 geni non correlati all'HLA (Lundin *et al*, 2015; Dieli-Crimi *et al*, 2015).

- *Infezioni gastrointestinali e respiratorie.* Infezioni gastrointestinali da Rotavirus nei bambini, infezioni da Campylobacter negli adulti, un aumento del numero totale di infezioni ed in particolare di infezioni respiratorie durante i primi 18 mesi di vita, sembrano aumentare il rischio di sviluppo della celiachia (Stene *et al*, 2006; Riddle *et al*, 2013) mentre, un'infezione da Epstein-Barr Virus (EBV) sembra essere associata alla condizione di celiachia refrattaria (Perfetti *et al*, 2016).

### ***1.3.2 Patogenesi***

La patogenesi della MC vede coinvolta una reazione immunitaria innescata dalle prolamine del glutine a livello intestinale (Figura 3).

Peptidi immunogenici specifici delle prolamine, resistenti alla digestione enzimatica gastrica e pancreatica, arrivano all'epitelio intestinale ed inducono l'aumento della zonulina. La zonulina, determinando l'aumento della permeabilità intestinale, permette ai peptidi prolamminici di raggiungere la lamina propria della mucosa intestinale. La presenza dei peptidi a livello della lamina propria determina nella mucosa intestinale la liberazione dell'enzima trans-glutaminasi tissutale di tipo II (tTG) nel comparto extracellulare. La tTG catalizza la deamidazione dei peptidi creando epitopi con maggiore affinità per le molecole DQ2 e DQ8 del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II. I peptidi delle prolamine vanno a legarsi alle molecole HLA DQ2 e/o DQ8 presenti sulla superficie di cellule presentanti l'antigene. Il legame peptide-HLA viene riconosciuto dai linfociti Thelper presenti nella lamina propria intestinale e si ha attivazione linfocitaria con conseguente rilascio di citochine pro-infiammatorie (IFN- $\gamma$ , IL-21, IL-17) da parte dei linfociti attivati. Le citochine secrete determinano: 1) infiammazione a livello intestinale, 2) attivazione di linfociti B con conseguente secrezione di anticorpi anti-gliadina, anti-endomisio ed anti-transglutaminasi tissutale, 3) rimodellamento tissutale per stimolazione di fibroblasti e cellule infiammatorie. Oltre all'attivazione dei linfociti Thelper della lamina propria, si ha un aumento dell'infiltrato linfocitario intraepiteliale che, grazie alla capacità citolitica, provoca distruzione dell'epitelio con conseguente atrofia dei villi intestinali (Caio *et al*, 2019; Stammaes *et al*, 2015; Tang *et al*, 2009; Tjon *et al*, 2010; Pagliari *et al*, 2015).



**Figura 3.** Patogenesi della celiachia

### ***1.3.3 Manifestazioni cliniche e diagnosi***

La MC si presenta con una sintomatologia estremamente variabile e, in base al quadro clinico, si distingue in: celiachia classica, non classica, silente, potenziale.

- *Celiachia classica (tipica)*. Si manifesta generalmente nei primi tre anni di vita e presenta sintomatologia intestinale caratterizzata da diarrea cronica, forti dolori addominali, distensione dell'addome, inappetenza, calo di peso ed arresto della crescita causato da malassorbimento. Nei casi più gravi può insorgere una riduzione dell'attività protrombinica da carenza di vitamina K ed edemi da ridotta quantità di proteine nel sangue.
- *Celiachia non classica (atipica)*. Si osserva dopo i 3 anni di età ed è caratterizzata da sintomatologia intestinale ed extra-intestinale. I sintomi più frequenti sono dolori addominali ricorrenti, stitichezza, stomatite aftosa ricorrente, dermatite erpetiforme, anemia megaloblastica dovuta a carenza di acido folico, anemia sideropenica, stanchezza cronica, ritardo puberale, osteopenia. Negli adulti è spesso accompagnata da disturbi della riproduzione e da un'entità maggiore, rispetto ai bambini, di osteopenia.

- *Celiachia silente.* È caratterizzata da alterazioni a livello della mucosa intestinale in assenza di sintomatologia. Frequentemente i pazienti nella forma silente vengono diagnosticati grazie a screening sierologico effettuato perché familiari di soggetti celiaci.
- *Celiachia potenziale.* I pazienti che presentano questa variante clinica hanno gli anticorpi specifici per la malattia celiaca e la positività per HLA DQ2 e/o DQ8 ma non hanno danni a livello della mucosa intestinale. Possono essere asintomatici oppure presentare sintomi (sintomi della celiachia classica oppure della celiachia atipica). Per questi pazienti, ad oggi, non è ancora chiaro se intervenire con la dieta senza glutine ma indubbiamente è necessario seguire nel tempo l'andamento clinico-laboratoristico (Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana AIC, 2015).

In presenza di sintomatologia sospetta di celiachia, le prime indagini da effettuare per fare diagnosi, sono esami sierologici mirati a riscontrare una positività per i geni HLA DQ2 e/o HLA DQ8 e la presenza di autoanticorpi specifici della malattia.

La celiachia è infatti caratterizzata da predisposizione genetica e da autoanticorpi specifici diretti contro la transglutaminasi di tipo 2 (anti-TG2), contro la gliadina deaminata (DGP), contro la transglutaminasi extracellulare (anticorpi anti-endomisio, EMA). Ad eccezione degli anticorpi DGP, gli anticorpi coinvolti nella malattia sono di classe IgA ed è per questo necessario, per non incorrere in falsi negativi, effettuare il dosaggio delle IgA totali per escludere un deficit da IgA (in caso di deficit da IgA vengono ricercati gli stessi anticorpi ma di classe IgG).

Se gli esami sierologici indicano positività per gli elementi analizzati, il passo successivo necessario per la diagnosi, è effettuare un campionamento tissutale multiplo a livello intestinale. Il campionamento tissutale permette di evidenziare alterazioni a livello della mucosa intestinale che caratterizzano il paziente celiaco. Viene effettuato tramite esofagogastroduodenoscopia e prevede il prelievo di 5 frammenti di tessuto: 4 provenienti dalla seconda/terza porzione del duodeno e 1 dal bulbo. In base all'esame istologico, se si rilevano danni tissutali si diagnostica la malattia celiachia; se non ci sono alterazioni del tessuto si ha di fronte una condizione di celiachia potenziale (Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana AIC, 2015).

### ***1.3.4 Terapia***

La completa e perenne esclusione del glutine dalla dieta è, ad oggi, l'unico trattamento disponibile per le persone affette da celiachia. Escludere il glutine dalla dieta determina un rapido miglioramento della sintomatologia (miglioramento che in base allo stadio della malattia varia da settimane a mesi), un ripristino dell'integrità dei villi intestinali che in base all'entità del danno può necessitare fino a due anni di dieta, una riduzione del rischio di complicanze che comprendono la celiachia refrattaria, il linfoma T-cellulare, l'atrofia della milza.

I pazienti celiaci, devono dunque evitare tutti i cereali del genere *Triticum*, l'orzo, la segale, l'avena (se presenta un contenuto di glutine superiore ai 20 ppm), i prodotti trasformati e/o confezionati dove durante il processo industriale viene aggiunto come additivo il glutine e possono invece consumare:

- alimenti che per natura sono privi di glutine: mais, riso, miglio, sorgo, teff, grano saraceno, quinoa, manioca, acqua, carne, pesce, uova, frutta, verdura, legumi, tuberi;
- alimenti e bevande trasformati che per natura, composizione e processo di produzione non prevedono l'utilizzo di ingredienti contenenti glutine: latte, formaggio, olio, aceto, zucchero, miele, marmellata, confettura, gelatina di frutta;
- prodotti alimentari appositamente formulati per i celiaci: alimenti e bevande trasformati che per tradizione nella formula di produzione prevedono ingredienti contenenti glutine ma che sono stati prodotti con ingredienti naturalmente privi di glutine o con prodotti deglutinati (bevande a base di frutta, preparazioni a base di frutta, preparazioni a base di carne, preparazioni a base di pesce, preparazioni a base di verdure, preparati per brodi e sughi, dessert vari, zuppe, minestre e minestrone di cereali, pane, pizza, pasta, biscotti e alimenti simili). Tali alimenti possono riportare l'etichetta volontaria "senza glutine" (Relazione Annuale al Parlamento sulla celiachia, 2017).

## 2. SCOPO

Nell'insorgenza e nella progressione del carcinoma coloretale (CRC) e della malattia celiaca (MC), il sistema immunitario svolge un ruolo fondamentale: mentre in ambito neoplastico è coinvolto nel riconoscimento delle cellule trasformate e nella loro eliminazione, nella celiachia è il sistema immunitario stesso ad innescare il danno.

Oltre al sistema immunitario, molti fattori sembrano influenzare l'insorgenza di tali patologie, e tra questi, sempre più studi indicano l'importanza del microbiota intestinale. Studi condotti su topi "germ free", dimostrano come il microbiota intestinale sia in grado di modulare la risposta immune, ed essendo quest'ultima coinvolta nelle neoplasie e nelle malattie autoimmuni, è facile ipotizzare che una disbiosi intestinale possa contribuire alla patogenesi delle malattie in esame.

Data dunque l'importanza della componente immunitaria nelle due patologie e l'ipotesi del coinvolgimento del microbiota intestinale, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare la risposta immune presente a livello tissutale e periferico nei pazienti con CRC e con MC e di analizzare la componente microbica presente nella sede intestinale dei pazienti. Individuare il tipo di risposta immune presente negli individui patologici ed i "cluster" microbici potenzialmente associati alle patologie, potrebbe indirizzare verso nuovi sistemi di prevenzione basati sull'immunoterapia oppure sull'impiego di trattamenti innovativi a base di probiotici (batteri vivi che potrebbero esercitare effetti positivi per la salute), prebiotici (ingredienti alimentari, non digeribili, che stimolano la crescita/attività dei batteri) e simbiotici.

Lo studio ha inoltre previsto di valutare la risposta immune ed il microbiota intestinale in pazienti affetti da poliposi intestinale e da malattia celiaca potenziale visto che le poliposi intestinali, se non trattate, molto spesso possono evolvere in tumore e che i pazienti con malattia celiaca potenziale presentano la predisposizione genetica e gli autoanticorpi specifici della MC senza avere un danno intestinale. Riconoscere, nei pazienti di controllo, elementi predittivi l'insorgenza della patologia permetterebbe di intervenire in maniera preventiva al fine di evitare l'evolversi della patologia tumorale e della celiachia.

## **3. MATERIALI E METODI**

### ***3.1 Casistica***

Con l'approvazione del comitato etico locale (numero registro pareri del Comitato Etico: 11166\_spe), per lo studio della risposta immunitaria e del microbiota intestinale nei pazienti affetti da carcinoma del colon retto (CRC), sono stati reclutati 70 pazienti: 51 pazienti con CRC (35 maschi e 16 femmine, Tabella 1) e 19 controlli di malattia (CM) affetti da poliposi intestinale (9 maschi e 10 femmine, Tabella 2). L'età dei pazienti CRC risultava compresa fra i 36 e gli 86 anni (età media 70 anni) mentre l'età dei pazienti CM fra i 39 e gli 87 anni con età media di 63 anni.

Di ciascun paziente ci è stato fornito, al momento dell'intervento chirurgico, un campione di sangue venoso eparinato, un campione di sangue venoso in provette contenenti microparticelle di silice, un campione fecale, un campione salivare e frammenti di mucosa intestinale che: nel caso dei pazienti CRC provenivano dalla regione centrale del tumore e dalla circostante mucosa sana mentre, nel caso dei CM dalla regione poliposica.

Per la valutazione della risposta immunitaria e del microbiota intestinale nei pazienti con celiachia (MC) a seguito dell'approvazione del comitato etico locale (numero registro pareri del Comitato Etico: 10443\_oss), sono stati reclutati 52 pazienti: 22 pazienti con MC (6 maschi e 16 femmine, Tabella 3) e 30 controlli di malattia con celiachia potenziale (MCP, 5 maschi e 25 femmine, Tabella 4).

L'età dei pazienti con MC risultava compresa fra i 16 e gli 84 anni (età media 37 anni) mentre l'età dei controlli risultava compresa fra i 17 ed i 55 anni con età media di 34 anni. Di tutti i pazienti arruolati nello studio ci è stato fornito un campione di sangue venoso in provette contenenti microparticelle di silice, un campione fecale mentre, soltanto di 22 pazienti, ci sono stati consegnati campioni di mucosa intestinale.

**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche dei pazienti con carcinoma coloretale.

<b>Codice</b>	<b>Sesso</b>	<b>ETÀ</b>	<b>Stato</b>
CRC1	M	68	Adenocarcinoma
CRC2	M	78	Adenocarcinoma
CRC3	M	40	Adenocarcinoma
CRC4	M	36	Adenocarcinoma
CRC5	M	80	Adenocarcinoma
CRC6	M	62	Adenocarcinoma
CRC7	F	78	Adenocarcinoma
CRC8	F	81	Adenocarcinoma
CRC9	M	84	Adenocarcinoma
CRC10	M	78	Adenocarcinoma
CRC11	M	75	Adenocarcinoma
CRC12	F	68	Adenocarcinoma
CRC13	M	86	Adenocarcinoma
CRC14	M	77	Adenocarcinoma
CRC15	F	73	Adenocarcinoma
CRC16	M	85	Adenocarcinoma
CRC17	M	82	Adenocarcinoma
CRC18	M	62	Adenocarcinoma
CRC19	M	59	Adenocarcinoma
CRC20	M	72	Adenocarcinoma
CRC21	F	75	Adenocarcinoma
CRC22	M	79	Adenocarcinoma
CRC23	M	72	Adenocarcinoma
CRC24	M	75	Adenocarcinoma
CRC25	M	75	Adenocarcinoma
CRC26	M	45	Adenocarcinoma
CRC27	F	57	Adenocarcinoma
CRC28	M	79	Adenocarcinoma
CRC29	F	64	Adenocarcinoma
CRC30	M	80	Adenocarcinoma
CRC31	F	69	Adenocarcinoma
CRC32	M	78	Adenocarcinoma
CRC33	M	66	Adenocarcinoma
CRC34	F	47	Adenocarcinoma
CRC35	M	85	Adenocarcinoma
CRC36	M	64	Adenocarcinoma
CRC37	M	83	Adenocarcinoma
CRC38	F	62	Adenocarcinoma
CRC39	F	75	Adenocarcinoma
CRC40	M	67	Adenocarcinoma
CRC41	M	69	Adenocarcinoma
CRC42	M	74	Adenocarcinoma
CRC43	F	65	Adenocarcinoma
CRC44	F	62	Adenocarcinoma
CRC45	F	72	Adenocarcinoma
CRC46	F	71	Adenocarcinoma
CRC47	M	83	Adenocarcinoma
CRC48	F	56	Adenocarcinoma
CRC49	M	72	Adenocarcinoma
CRC50	M	69	Adenocarcinoma
CRC51	M	73	Adenocarcinoma
<b>Totale pazienti CRC</b>	<b>16F+35M</b>	<b>età media: 70</b>	<b>51</b>

**Tabella 2.** Caratteristiche cliniche dei pazienti con poliposi intestinale.

Codice	Sesso	ETÀ	Stato
CM1	F	63	Poliposi
CM2	M	39	Poliposi
CM3	M	80	Poliposi
CM4	F	64	Poliposi
CM5	M	42	Poliposi
CM6	M	52	Poliposi
CM7	F	60	Poliposi
CM8	M	87	Poliposi
CM9	F	67	Poliposi
CM10	F	74	Poliposi
CM11	M	66	Poliposi
CM12	F	62	Poliposi
CM13	M	64	Poliposi
CM14	F	65	Poliposi
CM15	F	71	Poliposi
CM16	F	40	Poliposi
CM17	F	60	Poliposi
CM18	M	63	Poliposi
CM19	M	75	Poliposi
<b>Totale CM</b>	<b>10F+9M</b>	<b>età media: 63</b>	<b>19</b>

**Tabella 3.** Caratteristiche cliniche dei pazienti con celiachia.

Codice	Sesso	ETÀ	Stato
MC1	M	18	Celiachia
MC2	M	21	Celiachia
MC3	F	24	Celiachia
MC4	F	28	Celiachia
MC5	F	19	Celiachia
MC6	F	42	Celiachia
MC7	F	28	Celiachia
MC8	F	72	Celiachia
MC9	M	59	Celiachia
MC10	F	42	Celiachia
MC11	F	16	Celiachia
MC12	F	55	Celiachia
MC13	F	20	Celiachia
MC14	F	42	Celiachia
MC15	F	53	Celiachia
MC16	M	17	Celiachia
MC17	M	40	Celiachia
MC18	M	25	Celiachia
MC19	F	43	Celiachia
MC20	F	84	Celiachia
MC21	F	26	Celiachia
MC22	F	42	Celiachia
<b>Totale pazienti MC</b>	<b>16F+6M</b>	<b>età media: 37</b>	<b>22</b>

**Tabella 4.** Caratteristiche cliniche dei pazienti con celiachia potenziale.

Codice	Sesso	ETÀ	Stato
MCP1	F	22	Celiachia Potenziale
MCP2	F	21	Celiachia Potenziale
MCP3	F	27	Celiachia Potenziale
MCP4	F	55	Celiachia Potenziale
MCP5	F	21	Celiachia Potenziale
MCP6	F	44	Celiachia Potenziale
MCP7	F	29	Celiachia Potenziale
MCP8	F	47	Celiachia Potenziale
MCP9	F	33	Celiachia Potenziale
MCP10	F	19	Celiachia Potenziale
MCP11	F	33	Celiachia Potenziale
MCP12	F	41	Celiachia Potenziale
MCP13	F	32	Celiachia Potenziale
MCP14	M	49	Celiachia Potenziale
MCP15	M	18	Celiachia Potenziale
MCP16	F	52	Celiachia Potenziale
MCP17	F	32	Celiachia Potenziale
MCP18	F	30	Celiachia Potenziale
MCP19	F	46	Celiachia Potenziale
MCP20	F	46	Celiachia Potenziale
MCP21	M	17	Celiachia Potenziale
MCP22	F	41	Celiachia Potenziale
MCP23	F	31	Celiachia Potenziale
MCP24	M	24	Celiachia Potenziale
MCP25	F	24	Celiachia Potenziale
MCP26	F	53	Celiachia Potenziale
MCP27	F	41	Celiachia Potenziale
MCP28	M	36	Celiachia Potenziale
MCP29	F	40	Celiachia Potenziale
MCP30	F	22	Celiachia Potenziale
<b>Totale pazienti MCP</b>	<b>25F+5M</b>	<b>età media: 34</b>	<b>30</b>

### ***3.2 Caratterizzazione fenotipica e funzionale dell'infiltrato linfocitario***

- **Dissociazione dei tessuti**

I campioni tissutali sono stati dissociati con l'impiego dello strumento GentleMACS tissue dissociator (Miltenyi Biotec, Germany). In particolare, i tessuti sono stati inseriti all'interno di specifici tubi "gentleMACS C tube" (Miltenyi Biotec, Germany) concepiti per ottenere, in modo delicato, una sospensione di singole cellule a partire da un tessuto. La dissociazione è avvenuta in terreno completo (medium RPMI 1640 2.0 g/L  $\text{NAHCO}_3$  senza Glutamina (EuroClone, Italy), supplementato con 2mmol/L di L-Glutamina (EuroClone, Italy), 1% di Sodio Piruvato 100MM (Gibco Laboratories, USA), 1% di Aminoacidi Non Essenziali (NEAA) (Gibco Laboratories, USA),  $2 \times 10^{-5}$  mol/L di 2-Mercaptoetanololo (Sigma-Aldrich, USA) con l'aggiunta degli enzimi del kit Tumor Dissociation (Miltenyi Biotec, Germany). Attraverso la selezione di un protocollo validato della durata di circa 1 ora, il Tumor Dissociation Kit impiegato ha permesso di recuperare cellule tissutali vitali e strutturalmente inalterate.

- **Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie T tissutali tramite citofluorimetria**

Con l'utilizzo di anticorpi della ditta Miltenyi Biotec, è stata effettuata a fresco la caratterizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie T presenti nella sospensione cellulare ottenuta dalla dissociazione dei campioni tissutali. Tramite citofluorimetria le cellule sono state analizzate per l'espressione di CD4, CD8, CD25, CD127, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, IL-9, IL-22, FoxP3 e, sulla base del profilo citochinico e dell'espressione dei marcatori di superficie, sono state identificate le seguenti sottopopolazioni T: Th1-Tc1 (solo IFN- $\gamma$ ), Th2-Tc2 (solo IL-4), Th0-Tc0 (IL-4 e IFN- $\gamma$ ), Th17-Tc17 (IL-17), Th1/Tc17-Tc1/Tc17 (IFN- $\gamma$  e IL-17), Th9-Tc9 (IL-9), Th22-Tc22 (IL-22), Treg-Tcreg (CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>, FoxP3<sup>+</sup>). Per effettuare l'analisi, le cellule tissutali sono state risospese in terreno di coltura RPMI 1640 integrato con il 10% di FBS e sono state stimulate per 5 ore con il cocktail di attivazione leucocitaria (NR di Nannini srl, Italy). terminate le 5 ore di incubazione, le cellule sono state lavate con 1mL di PBS (Euroclone, Italy) e centrifugate a 1500 rpm per 10'. Al termine della centrifugazione, le cellule sono state marcate per gli antigeni di superficie CD4, CD8, CD25, CD127, fissate e permeabilizzate con paraformaldeide e saponina (per rilevare le Treg il passaggio di fissazione e permeabilizzazione, anziché essere effettuato con paraformaldeide e saponina, è stato effettuato con l'apposito kit BD Pharmigen Human FoxP3 Buffer Set - BD Biosciences,

USA). A questo punto, è stata effettuata la marcatura intracellulare con gli anticorpi anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4, anti-IL-17, anti-IL-22, anti-IL9, anti-FoxP3 e la lettura al BD FACScan con il software DIVA. Per le analisi il numero di eventi acquisito per ogni campione è stato di  $10^4$  cellule.

- **Clonazione dei linfociti T infiltranti il tessuto**

Nei pazienti dello studio riguardante la celiachia, il numero di cellule ottenuto dalla dissociazione tissutale non è stato sufficiente per effettuare l'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie a fresco. Al fine di ottenere informazioni sull'infiltrato linfocitario, le cellule T ricavate dalla dissociazione sono state utilizzate clonate ed espanse in coltura in modo da poter valutare le sottopopolazioni presenti. Le cellule T sono state clonate secondo la tecnica della diluzione limite (0,3 cellule per pozzetto) in micropiastre con pozzetti a fondo ad U contenenti  $10^5$  PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) eterologhe con funzione di cellule "feeder", irradiate a 9000 rad, in un volume finale di 0,2 ml di medium (terreno completo con l'aggiunta del 20% di HB basal medium ricostituito (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), del 10% di siero bovino fetale (FBS) Hyclone (Hyclone Laboratories, South Logan, Utah), di PHA (0,5% vol/vol; EuroClone) e di rIL-2 (50 U/ml; donata da Eurocetus Milano, Italy). Dopo 1 settimana, alle microcolture è stato tolto 0,1 ml di terreno ed aggiunto pari volume di medium contenente nuove cellule "feeder" irradiate. Tale procedimento è stato ripetuto ad intervalli settimanali e, dopo circa tre settimane, al microscopio ottico è stata valutata la presenza di cloni linfocitari T (Tcc) che, se presenti, venivano espantati e posti in espansione per ottenere per ciascun clone un numero di blasti T sufficiente a consentire lo studio fenotipico e funzionale. Al fine di valutare l'efficienza di clonazione, sono stati contemporaneamente messi in coltura linfociti T a diverso grado di diluzione limite. La frequenza delle cellule proliferanti o efficienza di clonazione è stata valutata mediante l'analisi della distribuzione Poissoniana, che correla il numero delle cellule poste in coltura alle varie diluizioni limite ed il logaritmo della percentuale delle colture non proliferanti.

- **Analisi citofluorimetrica dei marker superficiali dei cloni linfocitari T**

L'analisi dei marcatori di superficie dei cloni T è stata condotta attraverso citofluorimetria con l'impiego di anticorpi anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 (Miltenyi Biotec, Germany). Le cellule sono state analizzate con il BD FACScan utilizzando il software DIVA ed

acquisendo un totale di  $10^4$  eventi per campione. I Tcc risultanti  $CD3^+/CD4^+$  sono stati classificati come Thelper (Th) e quelli  $CD3^+/CD8^+$  classificati come Tcitotossici (Tc).

- **Caratterizzazione del profilo citochinico dei cloni linfocitari T**

Per dimostrare la produzione di citochine da parte dei Tcc,  $10^6$  blasti T di ciascun clone sono stati stimolati per 48 ore in 1 ml di medium completo arricchito con l'1% di PHA. Trascorse 48 ore, ogni campione è stato centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente e sono stati raccolti i surnatanti. In ogni surnatante cellulare è stata testata la presenza di IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, IL-10 con test ELISA (BioLegend, San Diego). I cloni T i cui surnatanti mostravano livelli di citochine superiori ai livelli medi più 5 deviazioni standard (DS) rilevati nei surnatanti di controllo (provenienti da cellule feeder irradiate), sono stati considerati positivi. In base al profilo citochinico ottenuto ed al fenotipo  $CD4^+/CD8^+$ , abbiamo classificato i Tcc nei seguenti gruppi: Th1-Tc1 (solo IFN- $\gamma$ ), Th2-Tc2 (solo IL-4), Th0-Tc0 (IFN- $\gamma$  e IL-4), Th17-Tc17 (IL-17), Th1/Th17-Tc1/Tc17 (IFN- $\gamma$  e IL-17), Treg-Tcreg (IL-10).

### ***3.3 Caratterizzazione dei linfociti T circolanti***

- **Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie T presenti a livello del sangue periferico**

Tramite centrifugazione su gradiente di densità sono state isolate, dai campioni di sangue venoso eparinato, le PBMCs. La separazione ha richiesto l'utilizzo della soluzione Ficoll (Lymphoprep, ditta Sentinel Italy), polimero di sintesi aggregante gli eritrociti che permette una separazione delle diverse componenti del sangue con una bassa e breve centrifugazione. Durante la centrifugazione avvengono migrazioni differenziali dei vari elementi del sangue che portano alla formazione di varie fasi distinte contenenti tipi cellulari diversi. A partire dal fondo della provetta troviamo: eritrociti, soluzione Ficoll, PBMCs a formare un anello ben visibile di colore bianco-avorio ed infine, plasma di colore giallo. Le PBMCs recuperate sono state risospese, ad una concentrazione di  $10^6$ , in terreno di coltura RPMI 1640 integrato con il 10% di FBS e stimolate per 5 ore utilizzando il cocktail di attivazione leucocitaria. Dopo le 5 ore di incubazione le cellule sono state lavate con 1mL di PBS e centrifugate a 1500 rpm per 10'. A termine della centrifugazione, le cellule sono state marcate per gli antigeni di superficie CD4, CD8, CD25, CD127; fissate e permeabilizzate (anche in questa marcatura per le Treg il

passaggio di fissazione e permeabilizzazione è stato effettuato con BD Pharmigen Human FoxP3 Buffer Set).

Una volta permeabilizzate è stata effettuata la marcatura intracellulare con gli anticorpi anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4, anti-IL-17, anti-IL-9, anti-IL-22, anti-FoxP3.

Le cellule sono state analizzate con il BD FACScan utilizzando il software DIVA, acquisendo un totale di  $10^4$  eventi per campione.

Basandoci sul profilo citochinico e l'espressione dei marcatori extracellulari, abbiamo identificato i seguenti sottoinsiemi di cellule T: Th1-Tc1 (solo IFN- $\gamma$ ), Th2-Tc2 (solo IL-4), Th0-Tc0 (IL-4 e IFN- $\gamma$ ), Th17-Tc17 (IL-17), Th1/Tc17-Tc1/Tc17 (IFN- $\gamma$  e IL-17), Th9-Tc9, Th22-Tc22 (IL-22), Treg-Tcreg (CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>, FoxP3<sup>+</sup>).

- **Analisi molecolare della risposta immunitaria periferica**

Il campione di sangue venoso presente nelle provette contenenti le microsfele di silice è stato centrifugato al fine di recuperare il siero dei pazienti. Nei campioni sierici ottenuti è stato dosato un pannello di 27 citochine (MIP1 $\alpha$ , IL27, IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL5, IP10, IL6, IL8, IL10, IL12p70, IL13, IL17 $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , MCP1, IL9, P-selectin, IL1 $\alpha$ , IL23, IL18, IL21, sICAM1, IL22, E-selectin) al fine di valutare la componente molecolare della risposta immunitaria. Per il dosaggio il kit utilizzato è stato il ProCartaPlex MixMatch Human 27 Panel della ditta ThermoFisher Scientific (Italy) e l'analisi è stata effettuata con tecnologia Luminex.

### ***3.4 Analisi del microbiota intestinale***

- **Estrazione del DNA dai campioni fecali, tissutali e salivari**

Attraverso il kit PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation, è stato estratto il DNA presente nei campioni fecali e nei frammenti tissutali.

Al fine di verificare la corretta estrazione del DNA, è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8% in Tris-EDTA buffer dei campioni estratti ed una quantificazione tramite Qubit fluorometer (Life Technologies). Tutti i campioni sono stati mantenuti a - 20°C fino al momento del sequenziamento.

- **Analisi del gene 16SRNA**

I campioni di DNA estratti sono stati inviati ad un servizio di sequencing esterno (IGA Technology) che ha effettuato l'amplificazione ed il sequenziamento delle regioni V3-V4 del gene 16S rRNA batterico. Per amplificare il gene 16S rRNA batterico è stata effettuata

la Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizzando primers specifici (806R e 515F) mentre il sequenziamento è stato eseguito con tecnologia Illumina MiSeq.

Le sequenze grezze sono state elaborate con la pipeline “micca” che utilizza prevalentemente il software VSEARCH.

Le sequenze appaiate sono state assemblate utilizzando il comando “mergepairs” mantenendo un overlap minimo di 100 bp ed una distanza di edit nell’overlap di massimo 32. Successivamente le sequenze sono state tagliate con il comando “trim” in modo da rimuovere i primers ed eventualmente eliminare le reads con sequenze di primers imperfette. Infine, con il comando “filter” sono state eliminate tutte le reads con lunghezza inferiore a 350 bp e con un tasso di errore di 0.5.

Le reads sono state poi fuse in un unico file con il comando “merge”, e trasformate in un file fasta, prima di procedere con la creazione delle OTU mediante il comando “otu” in modalità “denovo\_greedy”, fissando una identità del 97% ed eseguendo una rimozione automatica delle chimere con l’opzione “-c”. La sequenza più lunga di ogni OTU è stata utilizzata per l’assegnazione tassonomica mediante il comando “classify” in modalità “rdp”, cioè utilizzando il classificatore bayesiano che è in grado di emettere classificazione e confidenza per ranghi fino al genere.

### ***3.5 Analisi statistica dei dati***

- **Analisi statistica dei dati immunologici**

L’analisi statistica è stata eseguita con il software statistico SPSS (versione 24) ed i dati sono stati espressi con la media dei valori  $\pm$  DS. I confronti tra il gruppo CRC ed il gruppo CM sono stati valutati con il test t di Student e le correlazioni tra i parametri sono state effettuate utilizzando il test Mann-Whitney: le differenze con p value < 0,05 sono state considerate statisticamente significative.

- **Analisi statistica dei dati microbiologici**

Tramite il software R (R Core Team, 2014), utilizzando il phyloseq package (versione 2.3-2) e con l’aiuto di library aggiuntive, sono state effettuate le analisi statistiche sulla distribuzione della comunità batterica, ed analisi di somiglianza, sono state condotte per rilevare differenze significative tra le comunità batteriche riscontrate.

Con la funzione “re” del phyloseq package versione 2.4, sono state calcolate le curve di accumulazione con aggiunta di siti random con 100 permutazioni per ciascuno passo. Differenze nella struttura della popolazione batterica tra diversi body sites sono stati

ispezionati utilizzando la funzione "anosim" con 1.000 permutazioni e con la libreria ggplot2 (versione 2.2). I cluster batterici sono stati analizzati con la metodica Hierarchical clustering utilizzando gli indici di similarità di Bray-Curtis e visualizzati usando custom scripts.

In tutti i campioni analizzati, la conta delle OTU assegnate ad ogni cluster batterico è stata normalizzata rapportandola al totale di tutte le OTU presenti all'interno del campione in analisi.

La differenza di abbondanza delle OTU è stata rilevata utilizzando il sistema DESeq2.

Gli indici di diversità (Shannon, Chao 1) e di ricchezza sono stati calcolati per ogni campione ed utilizzati per stimare, le differenze composizionali presenti tra i gruppi di pazienti, mediante test di Wilcoxon.

## 4. RISULTATI

### *4.1 Analisi della risposta immunitaria e del microbiota intestinale nei pazienti con carcinoma coloretale*

Questa parte dello studio si è incentrata sull'analisi delle caratteristiche fenotipiche-funzionali delle sottopopolazioni linfocitarie T presenti a livello dei campioni tissutali ed ematici di pazienti con carcinoma coloretale (CRC); sull'analisi molecolare della risposta immunitaria periferica; sull'analisi del microbiota intestinale di tali pazienti.

Per effettuare le analisi, abbiamo provveduto all'arruolamento di 51 pazienti affetti da CRC e 19 controlli di malattia (soggetti affetti da poliposi intestinale, CM).

In una prima fase dello studio, campioni di tessuto neoplastico ottenuti dai pazienti CRC e biopsie di mucosa intestinale prelevate dai CM sono stati dissociati e, nella sospensione cellulare ottenuta, sono state caratterizzate tramite citofluorimetria le sottopopolazioni linfocitarie T presenti.

In una seconda fase, campioni ematici dei pazienti con CRC e CM sono stati processati in modo da ottenere il siero dei pazienti e da isolare le cellule mononucleate presenti nel sangue periferico. Le cellule sono state analizzate tramite citofluorimetria al fine di caratterizzare le sottopopolazioni linfocitarie T circolanti mentre, nei campioni sierici, è stata effettuata l'analisi molecolare della risposta immunitaria tramite dosaggio citochinico con tecnologia Luminex.

In una terza fase dello studio, è stata condotta l'analisi del microbiota intestinale dei pazienti arruolati.

#### ***4.1.1 Analisi dell'infiltrato linfocitario nei pazienti con CRC e nei CM***

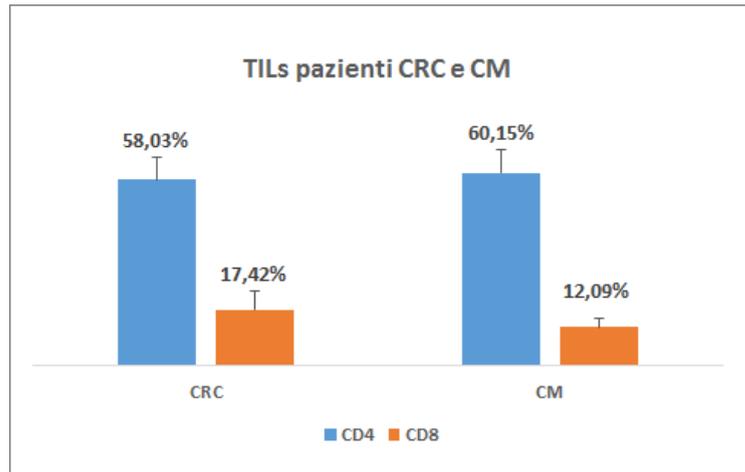
A seguito della dissociazione tissutale, a “fresco” è stata eseguita l'analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni linfocitarie T presenti a livello della regione centrale del tumore dei pazienti CRC e del tessuto poliposico dei CM.

Le cellule sono state caratterizzate per l'espressione di CD4, CD8, CD25, CD127, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, IL-9, IL-22, FoxP3, identificandole nelle seguenti sottopopolazioni: Th1-Tc1 (solo IFN- $\gamma$ ), Th2-Tc2 (solo IL-4), Th17-Tc17 (IL-17), Th1/Tc17-Tc1/Tc17 (IFN- $\gamma$  e IL-17), Th9-Tc9 (IL-9), Th22-Tc22 (IL-22), Treg-Tcreg (CD25+, CD127-, FoxP3+).

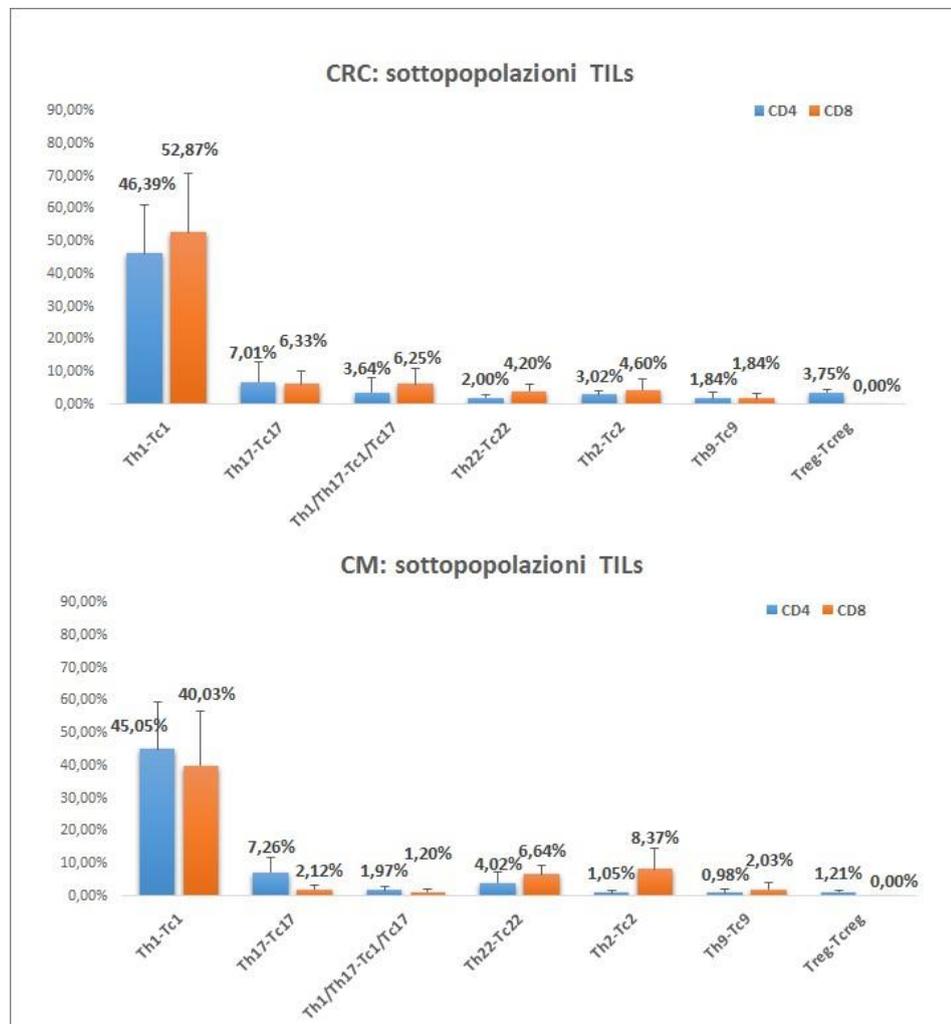
Dall'analisi citofluorimetrica è emerso un infiltrato linfocitario T caratterizzato prevalentemente, in entrambe i gruppi di pazienti, da linfociti Thelper ( $58,03 \pm 6,89\%$  nei CRC;  $60,15 \pm 7,04\%$ ) con percentuali di linfociti Tcitotossici maggiori nei pazienti CRC ( $17,42 \pm 5,65\%$  vs  $12,09 \pm 2,76\%$  nei CM) (Figura 4).

Nei pazienti CRC, a livello dell'infiltrato linfocitario T è emersa la prevalenza di sottopopolazioni producenti le citochine proinfiammatorie IFN- $\gamma$  ed IL-17. Nonostante l'abbondanza di tali sottopopolazioni, è stata riscontrata la presenza di popolazioni producenti IL-4, IL-22 ed IL-10 che svolgono un ruolo importante in ambito tumorale. Confrontando l'infiltrato linfocitario dei pazienti CRC con l'infiltrato dei CM (Figura 5), a riguardo dei linfociti CD4<sup>+</sup> è emerso nei pazienti CRC: una percentuale maggiore di Th1 ( $46,39 \pm 14,77\%$  vs  $45,05 \pm 14,47\%$ ;  $p > 0,05$ ), di Th1/Th17 ( $3,64 \pm 4,61\%$  vs  $1,97 \pm 1,21\%$ ;  $p > 0,05$ ), di Th2 ( $3,02 \pm 1,20\%$  vs  $1,05 \pm 0,89\%$ ;  $p < 0,05$ ), di Th9 ( $1,84 \pm 1,83\%$  vs  $0,98 \pm 1,15\%$ ;  $p > 0,05$ ) e di Treg ( $3,75 \pm 1,06\%$  vs  $1,21 \pm 0,73\%$ ;  $p < 0,05$ ) con differenze significative a riguardo dei Th2 e Treg; una percentuale minore di Th17 ( $7,01 \pm 6,28\%$  vs  $7,26 \pm 4,55\%$ ;  $p > 0,05$ ) e di Th22 ( $2,00 \pm 1,70\%$  vs  $4,02 \pm 3,27\%$ ;  $p > 0,05$ ) rispetto ai CM.

Dal confronto dei linfociti T CD8<sup>+</sup> isolati dai tessuti dei pazienti CRC con quelli isolati dai tessuti dei pazienti CM, è stata riscontrata nei pazienti CRC: una percentuale maggiore di Tc1 ( $52,87 \pm 18,16\%$  vs  $40,03 \pm 16,86\%$ ;  $p > 0,05$ ), di Tc17 ( $6,33 \pm 3,98\%$  vs  $2,12 \pm 1,26\%$ ;  $p < 0,05$ ), e di Tc1/Tc17 ( $6,25 \pm 4,74\%$  vs  $1,20 \pm 0,90\%$ ;  $p < 0,05$ ) con differenze significative per i Tc17 e Tc1/Tc17; una percentuale minore di Tc2 ( $4,60 \pm 3,27\%$  vs  $8,37 \pm 6,43\%$ ;  $p < 0,05$ ), di Tc22 ( $4,20 \pm 2,07\%$  vs  $6,64 \pm 2,90\%$ ;  $p > 0,05$ ) e di Tc9 ( $1,84 \pm 1,60\%$  vs  $2,03 \pm 2,23\%$ ;  $p > 0,05$ ) con differenze significative a carico della sottopopolazione Tc2. Nei pazienti CRC e nei CM non si sono riscontrati linfociti Tcreg (Figura 5).



**Figura 4.** Distribuzione (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) dei linfociti T infiltranti il tessuto (TILs) di pazienti con CRC e CM.



**Figura 5.** Distribuzione fenotipica (pattern citochinico) dei linfociti T isolati dal tessuto di pazienti con CRC e CM.

### ***4.1.2 Analisi dei linfociti T circolanti nei pazienti con CRC***

Tramite citofluorimetria sono state analizzate anche le sottopopolazioni linfocitarie T presenti a livello del sangue periferico dei pazienti CRC e CM.

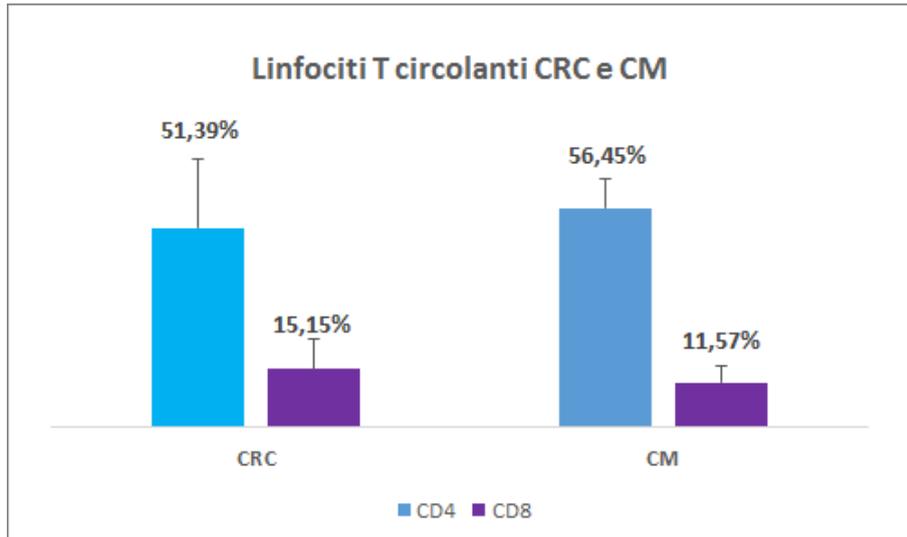
Le cellule sono state caratterizzate per l'espressione di CD4, CD8, CD25, CD127, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, IL-22, IL-9, FoxP3 e catalogate nelle seguenti sottopopolazioni: Th1-Tc1, Th2-Tc2, Th17-Tc17, Th1/Tc17-Tc1/Tc17, Th22-Tc22, Th9-Tc9, Treg-Tcreg.

A livello periferico è stata riscontrata una percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> maggiore nei CRC rispetto ai CM ( $15,15 \pm 7,56\%$  vs  $11,57 \pm 4,49\%$ ) e, l'insieme linfocitario T, è emerso in entrambe i gruppi caratterizzato da una prevalenza di cellule Thelper ( $51,39 \pm 17,67\%$  nei CRC e  $56,45 \pm 7,69\%$  nei CM) (Figura 6).

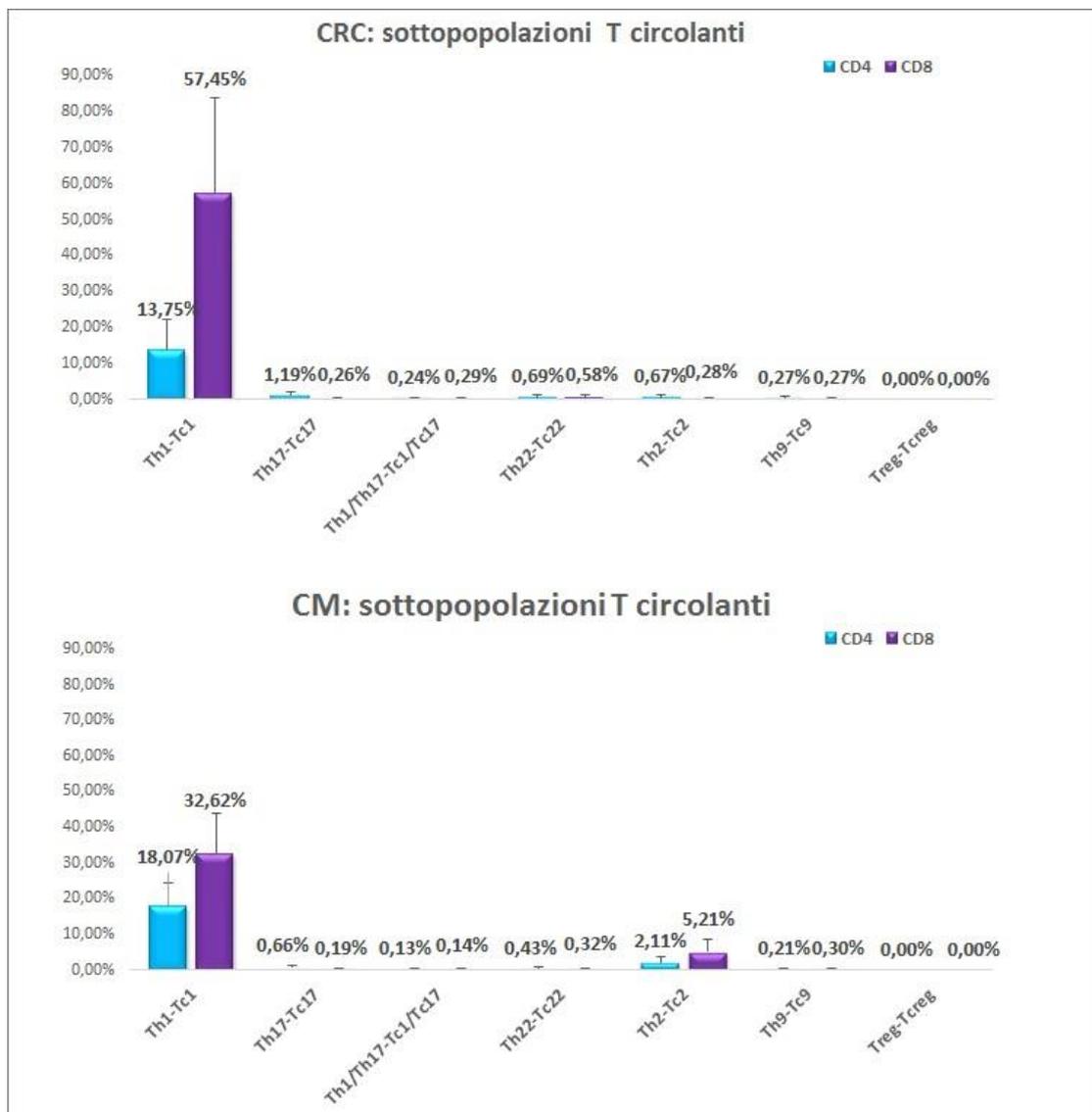
Nel dettaglio, nei linfociti T CD4<sup>+</sup> isolati dal sangue periferico dei pazienti CRC è stata riscontrata, rispetto alla controparte dei pazienti CM: una percentuale maggiore di Th17 ( $1,19 \pm 1,10\%$  vs  $0,66 \pm 0,49\%$ ;  $p > 0,05$ ), di Th1/Th17 ( $0,24 \pm 0,23\%$  vs  $0,13 \pm 0,12\%$ ;  $p > 0,05$ ); di Th22 ( $0,69 \pm 0,79\%$  vs  $0,43 \pm 0,31\%$ ;  $p > 0,05$ ), di Th9 ( $0,27 \pm 0,57\%$  vs  $0,21 \pm 0,32\%$ ;  $p > 0,05$ ); una percentuale minore di Th1 ( $13,75 \pm 8,53\%$  vs  $18,07 \pm 6,20\%$ ;  $p > 0,05$ ) e di Th2 ( $0,67 \pm 0,75\%$  vs  $2,11 \pm 1,45\%$ ;  $p < 0,05$ ) con differenze significative a carico dei Th2 (Figura 7).

Nei linfociti T CD8<sup>+</sup> isolati a livello periferico nei CRC è stata riscontrata rispetto ai quelli isolati nei CM: una percentuale maggiore di Tc1 ( $57,45 \pm 26,34\%$  vs  $32,62 \pm 11,10\%$ ;  $p < 0,05$ ), di Tc17 ( $0,26 \pm 0,26\%$  vs  $0,19 \pm 0,13\%$ ;  $p > 0,05$ ), di Tc1/Tc17 ( $0,29 \pm 0,34\%$  vs  $0,14 \pm 0,10\%$ ;  $p > 0,05$ ), di Tc22 ( $0,58 \pm 0,95\%$  vs  $0,32 \pm 0,14\%$ ;  $p > 0,05$ ) con dati significativi a riguardo della sottopopolazione Tc1; una percentuale minore di Tc2 ( $0,28 \pm 0,37\%$  vs  $5,21 \pm 3,21\%$ ;  $p < 0,05$ ) e di Tc9 ( $0,27 \pm 0,41\%$  vs  $0,30 \pm 0,014\%$ ;  $p > 0,05$ ) con differenze significative per la sottopopolazione Tc2 (Figura 7).

Sia nei pazienti CRC che CM, a livello periferico, non sono stati rilevati linfociti produttori IL-10 (Figura 7).



**Figura 6.** Distribuzione (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) dei linfociti T circolanti di pazienti con CRC e CM.



**Figura 7.** Distribuzione fenotipico (pattern citochinico) dei linfociti T circolanti isolati dal sangue periferico di pazienti con CRC e CM.

### ***4.1.3 Analisi molecolare della risposta immunitaria nei pazienti con CRC***

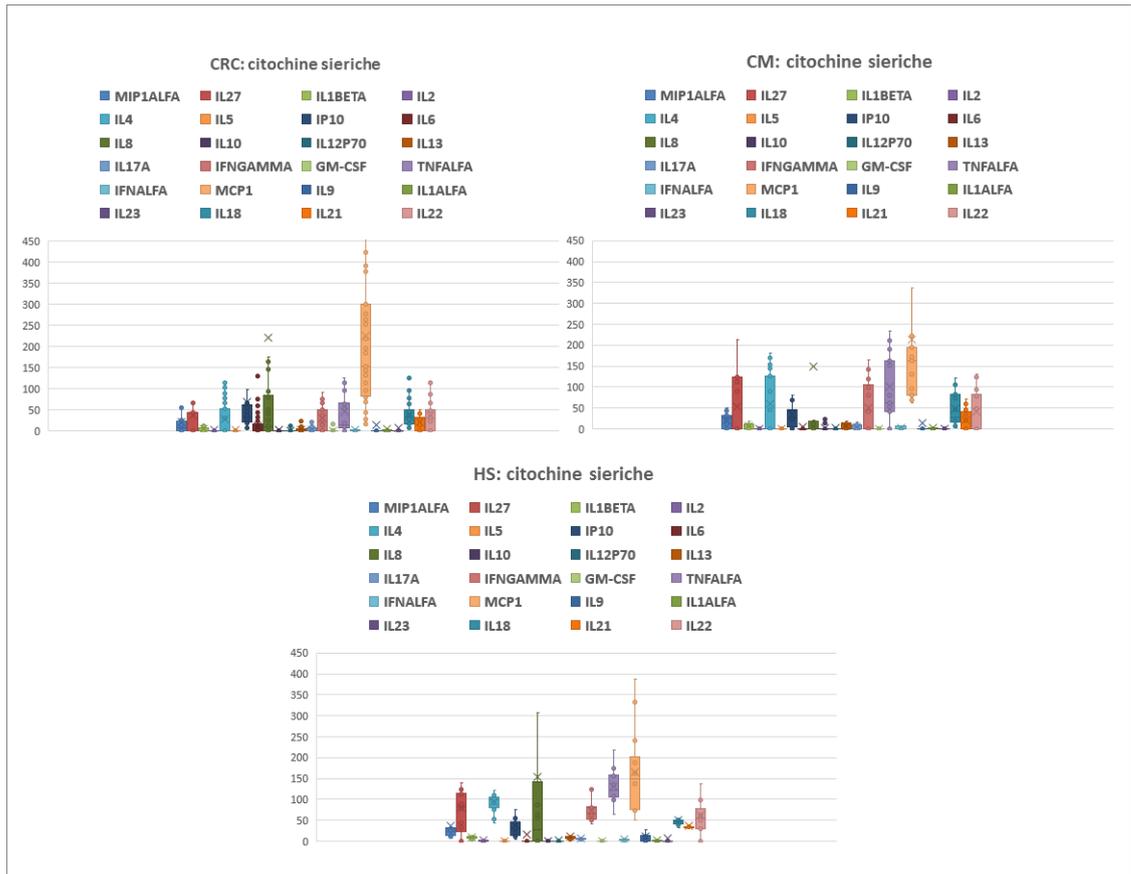
Per valutare, dal punto di vista molecolare, la risposta immunitaria a livello periferico nei pazienti con CRC, è stato dosato un pannello di 27 citochine infiammatorie (MIP1 $\alpha$ , IL27, IL1b, IL2, IL4, IL5, IP10, IL6, IL8, IL10, IL12p70, IL13, IL17 $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , MCP1, IL9, P-selectin, IL1- $\alpha$ , IL23, IL18, IL21, sICAM-1, IL22, E-selectin) tramite tecnologia Luminex.

Il dosaggio è stato condotto sui campioni sierici di 48 pazienti CRC, di 17 CM, ed al fine di osservare quanto il quadro infiammatorio dei pazienti si discostasse da quello presente in soggetti sani (HS), il dosaggio è stato effettuato anche su una sieroteca presente in laboratorio costituita da 12 campioni sierologici di individui non aventi patologie (Figura 8, Figura 9).

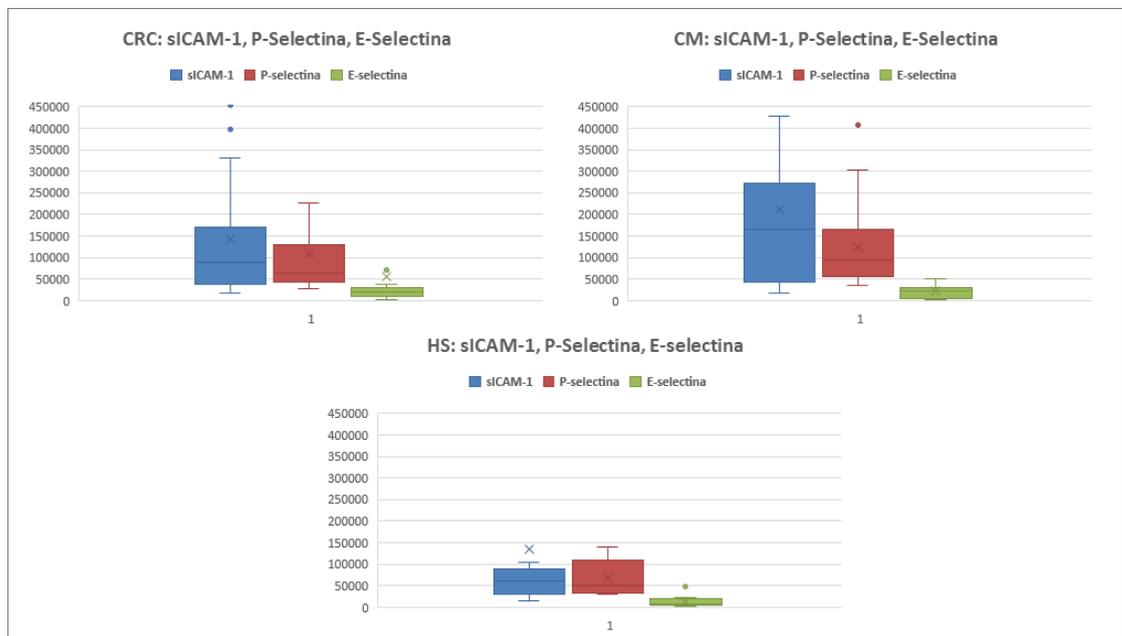
Il dosaggio ha rilevato in tutti i pazienti CM e HS valori delle citochine IL-5, GM-CSF e IL-23 sotto i limiti di rilevazione dello strumento e, soltanto in 2/48 pazienti CRC, si è riscontrata la presenza di una o più delle suddette citochine contemporaneamente.

Confrontando i valori medi delle citochine rilevati nei campioni dei pazienti CRC con quelli relativi ai campioni dei CM: l'analisi ha mostrato una quantità di citochine totali minore nei CRC rispetto ai CM senza però mostrare differenze significative.

Inoltre, i valori delle citochine rilevati nei campioni dei pazienti CRC e dei CM sono stati confrontati con i valori riscontrati nei HS. L'analisi ha mostrato sia nei CRC che nei CM una quantità totale di citochine inferiore rispetto ai HS ma, andando ad effettuare l'analisi statistica dei dati, differenze significative sono state rilevate soltanto tra i pazienti CRC ed i soggetti sani: nei pazienti CRC sono risultati significativamente diminuiti i valori delle citochine pro-infiammatorie TNF $\alpha$  ( $p = 0,0002$ ), IFN $\alpha$ , ( $p = 0,0069$ ), IFN $\gamma$  ( $p = 0,0022$ ), IL13 ( $p = 0,0002$ ), IL17A ( $p = 0,0145$ ), IL4 ( $p = 0,0004$ ) e delle citochine regolatorie IL-21 ( $p = 0,0114$ ) ed IL-27 ( $p = 0,0307$ ).



**Figura 8.** Livelli sierici di 24 citochine rilevate nei pazienti con CRC, CM e nei HS.



**Figura 9.** Livelli sierici delle citochine E-selectina, P-Selectina e sICAM-1 riscontrate nei pazienti con CRC, CM e nei HS.

#### **4.1.4 Analisi del microbiota intestinale**

##### **4.1.4.1 Comparazione del microbiota orale, fecale e tissutale nei pazienti con CRC**

Prima di procedere con l'estrazione ed il sequenziamento del DNA di tutti i campioni fecali e tissutali dei pazienti con CRC e dei CM, è stato effettuato uno studio preliminare che ha riguardato l'analisi delle comunità batteriche presenti nella cavità orale e nell'intestino di 10 pazienti con CRC e 10 controlli sani (HS).

Il DNA è stato estratto da 10 campioni di tessuto tumorale, da 20 campioni fecali e 20 campioni di saliva appartenenti ai 10 pazienti con CRC ed ai 10 HS.

Dal sequenziamento del DNA estratto da tutti i campioni in analisi, sono state ottenute sequenze di rRNA 16S di alta qualità appartenenti principalmente a cinque phyla: *Firmicutes* (39,18%), *Bacteroidetes* (30,36%), *Proteobacteria* (10,65%), *Fusobacteria* (5,15%) e *Actinobacteria* (4,22%) (Figura 10).

Valutando e confrontando la diversità e ricchezza microbica (alpha diversity) presente nei campioni dei pazienti con CRC con i dati relativi ai campioni dei soggetti sani, non sono emerse differenze significative tra i due gruppi ma delle differenze significative sono invece state osservate confrontando tra loro i diversi distretti. In particolare, nei pazienti con CRC i campioni tissutali presentavano valori più elevati dell'indice di Shannon ( $\chi^2 = 9,9$ ,  $p = 0,007$ ) e di Evenness ( $\chi^2 = 10,9$ ,  $p = 0,004$ ) rivelando l'elevata complessità del microbiota presente.

Al fine di osservare le differenze tra i vari distretti e tra i due gruppi di individui in esame, tramite l'analisi di somiglianza è stata valutata la differente composizione della comunità batterica presente nei campioni.

L'analisi ha mostrato differenze ( $R = 0,834$ ,  $p = 0,001$ ) tra i diversi distretti analizzati ed in particolare nei pazienti CRC è emersa una netta differenza tra la comunità batterica presente nei campioni tissutali e la comunità batterica dei campioni fecali ( $R = 0,61$ ,  $p = 0,001$ ; Figura 11, Figura 12). Inoltre, l'analisi di somiglianza, ha fatto emergere differenze tra i campioni fecali dei pazienti con CRC ed i campioni fecali dei soggetti sani ( $R = 0,201$ ,  $p = 0,005$ ; Figura 11, Figura 12).

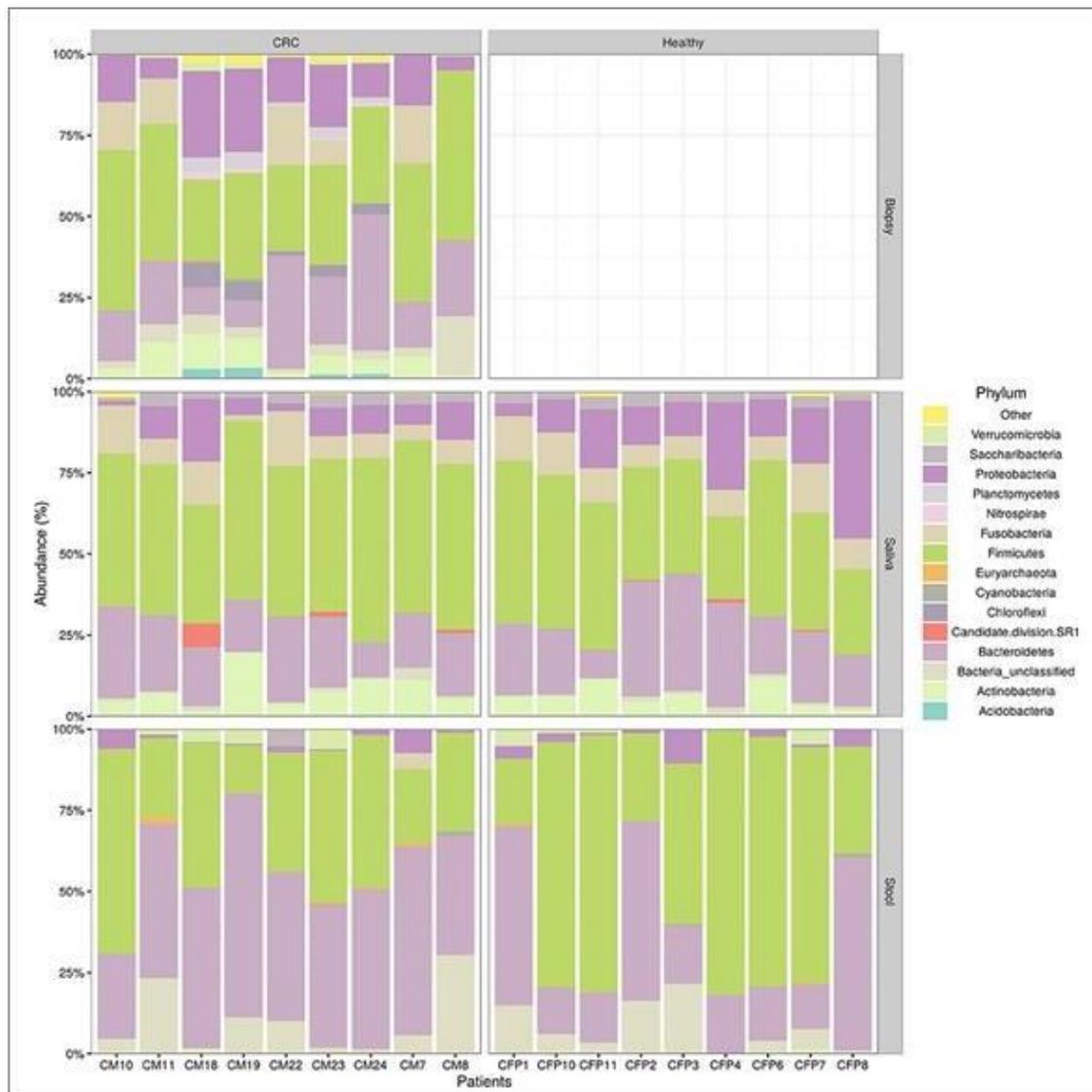
Effettuando l'analisi gerarchica dei cluster basata sull'abbondanza delle OTU ottenute: è stato confermato che i campioni salivari dei pazienti con CRC non presentano differenze statisticamente significative rispetto ai soggetti sani ( $R = 0,049$ ,  $p = 0,176$ ). I campioni di tessuto tumorale hanno mostrato il più alto valore di alpha diversity rispetto agli altri

distretti analizzati mentre la diversità tassonomica presente nei campioni dei pazienti con CRC e nei soggetti sani era simile degli stessi distretti (Figura 11).

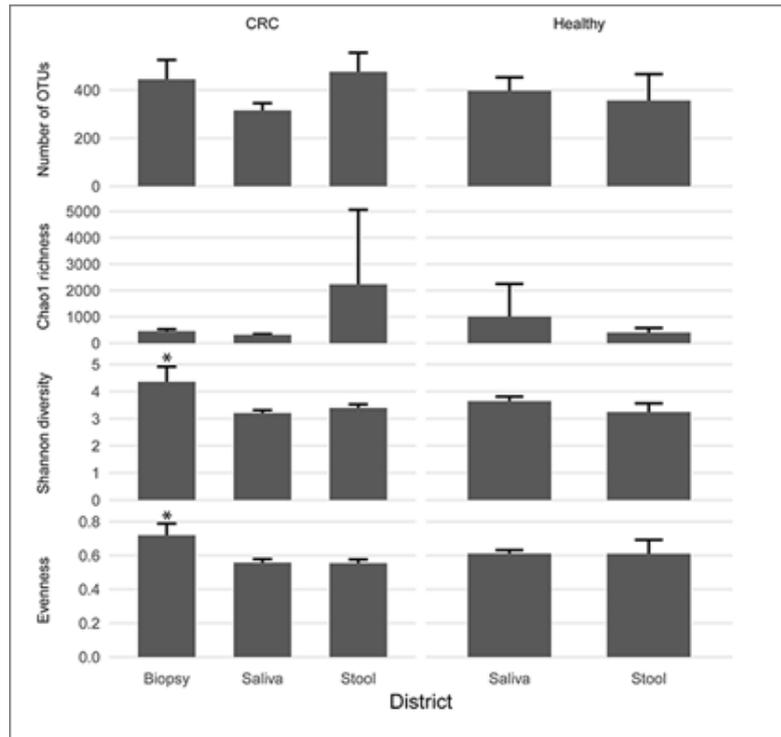
Al contrario, i campioni di tessuto tumorale sembrano avere un modello distinto di distribuzione batterica (Figura 13) con un'ampia distribuzione di generi batterici appartenenti ai principali phyla precedentemente rilevati (*Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*).

L'analisi discriminante lineare (Figura 14 A) ha rivelato una distribuzione microbica distinta rispetto al sito di campionamento: 1) i campioni di saliva presentavano principalmente membri di *Actinobacteria*, *Saccharibacteria*, *Betaproteobacteria*, *Fusobacteria*, *Firmicutes* (principalmente *Negativicutes* and *Bacilli*) e *Bacteroidetes* (rappresentati esclusivamente dai membri della classe *Flavobacteriia* e della famiglia *Prevotellaceae*); 2) i campioni di feci presentavano una distribuzione caratteristica di *Bacteroidetes* (in particolare la classe *Bacteroidia*) e *Firmicutes* (principalmente classi *Clostridia* ed *Erysipelotrichia*); 3) i campioni di biopsia erano principalmente caratterizzati da membri di *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Planctomycetes* e *Firmicutes* (famiglia *Lachnospiraceae* e *Clostridiales XI*).

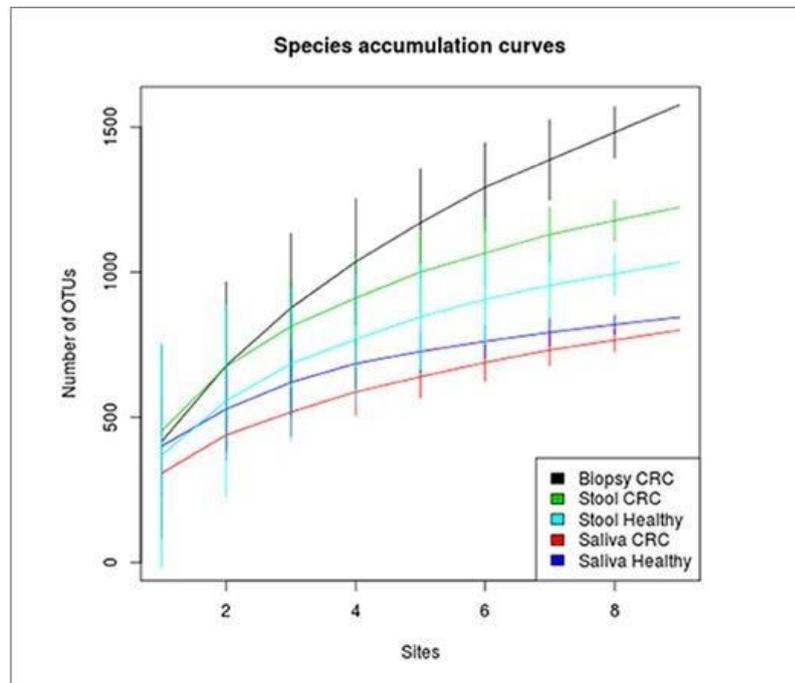
Nonostante la maggiore abbondanza di membri del phylum *Fusobacteria* sia stata riscontrata nei campioni di saliva (Figura 14 B), nei campioni di biopsia è stata riscontrata abbondanza del genere *Fusobacterium* (Figura 14 C).



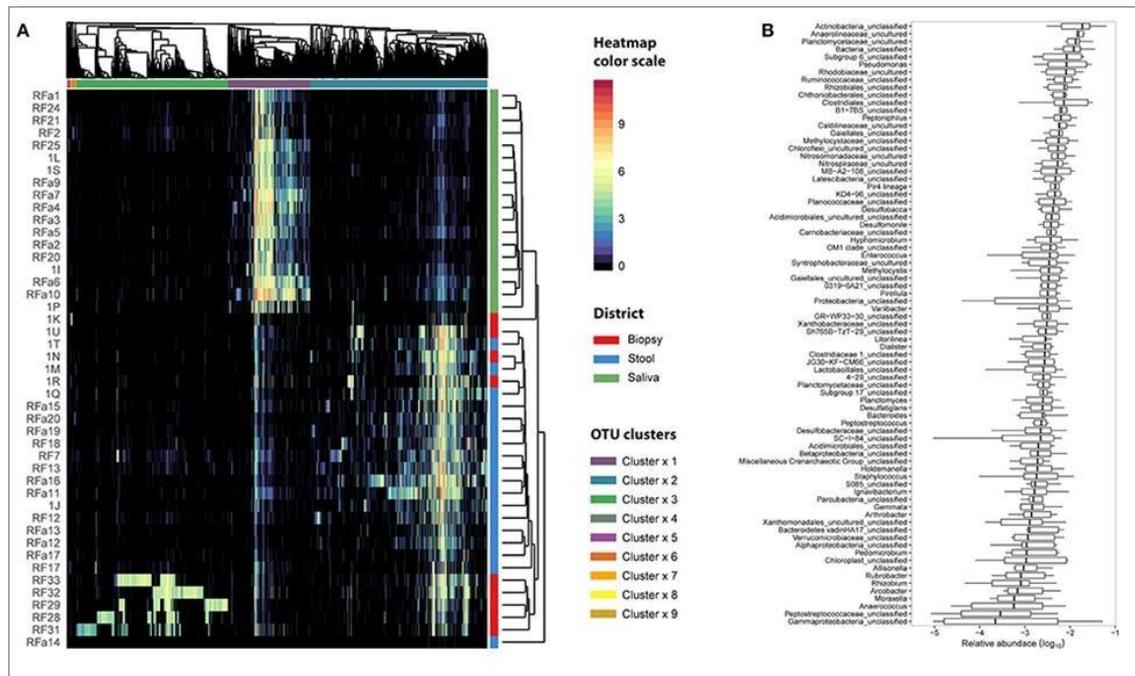
**Figura 10.** Composizione tassonomica del microbiota dei pazienti affetti da CRC e dei controlli sani. Il grafico a barre mostra l'abbondanza relativa dei phyla batterici in ciascun campione. Tutti i phyla che rappresentano meno del 5% delle letture totali analizzate sono stati inclusi nel gruppo "Altro".



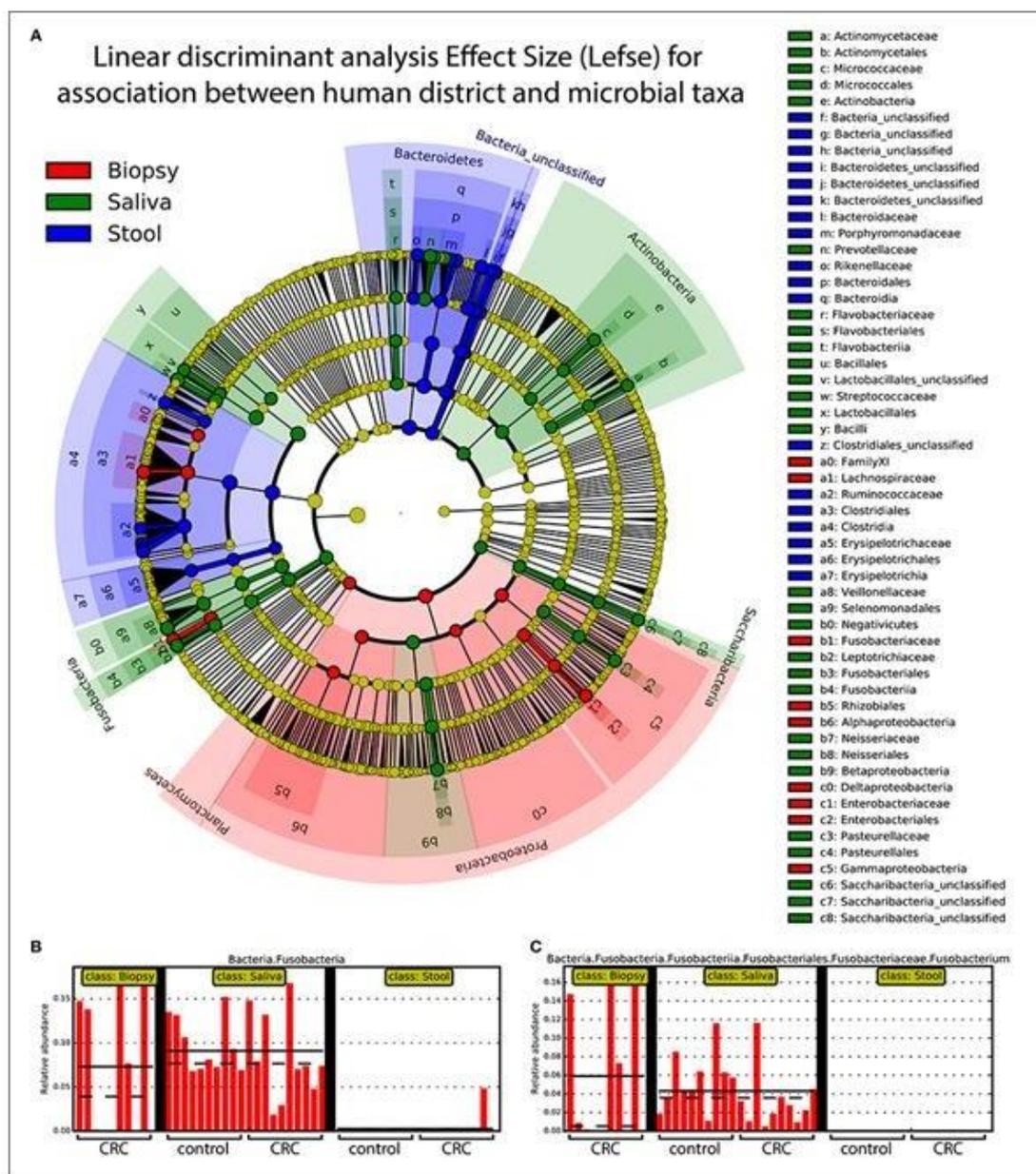
**Figura 11.** Distribuzione degli indici di biodiversità in base al sito di campionamento ed allo stato del paziente. I pazienti con CRC ed i soggetti sani hanno riportato valori di diversità simili per tutti gli indici considerati. I pazienti con CRC hanno mostrato valori più elevati di  $\alpha$  diversity nei campioni di biopsia. Gli asterischi indicano la significatività statistica con  $p < 0,05$ .



**Figura 12.** Curve di accumulo di specie relative ai distretti dei pazienti con CRC e dei soggetti sani.



**Figura 13.** Distribuzione del microbiota per ciascun campione analizzato. (A) Il numero di letture assegnate a ciascuna OTU è stato trasformato e registrato utilizzando la scala dei colori mentre i siti di campionamento sono stati riportati con colori diversi (rosso per campioni di biopsia, blu per campioni di feci e verde per campioni di saliva). Dendrogrammi sono stati prodotti con metodo di clustering medio (UPGMA) basato sulla distanza di Bray-Curtis. (B) L'abbondanza relativa di OTU appartenenti al cluster 3 è stata collapsata a livello di genere tenendo conto solo dei campioni tissutali. Generi batterici con un'abbondanza inferiore all'1% sono stati rimossi dall'analisi. L'abbondanza relativa è stata calcolata dividendo il numero di sequenze 16S assegnate a ciascuna OTU per il numero totale di sequenze ottenute per ciascun campione. Le caselle indicano l'intervallo interquartile (IQR) tra il 25 ° e il 75 ° percentile (primo e terzo quartile), mentre la linea interna rappresenta la mediana. I baffi rappresentano i valori più bassi e più alti entro 1,5 volte IQR dal primo e terzo quartile. I valori anomali sono stati riportati usando cerchi bianchi.



**Figura 14.** **A)** Analisi discriminante lineare dell'associazione tra siti di campionamento ed i taxa microbici; **(B)** Abbondanza relativa di *Fusobacteria* nei diversi distretti ed individui; **(C)** Abbondanza relativa del genere *Fusobacterium* nei diversi distretti e individui.

#### 4.1.4.2 Analisi del microbiota tissutale dei pazienti con CRC

Per ottenere informazioni più accurate sulla composizione del microbiota tissutale dei pazienti con CRC è stata effettuata l'analisi meta-tassonomica del DNA batterico estratto dal tessuto tumorale dei pazienti. I dati meta-tassonomici ottenuti sono stati poi comparati con i dati relativi al DNA batterico ricavato dai campioni tissutali dei CM.

Con gli indici “observed OTU”, “Chao 1” e “Shannon” è stata valutata la diversità e ricchezza microbica presente nei campioni tissutali dei pazienti CRC ed è stato effettuato il confronto con i dati relativi ai campioni dei CM ma l’analisi non ha mostrato tra i due gruppi differenze significative.

Procedendo con l’analisi tassonomica della comunità batterica presente nei campioni dei CRC e dei CM, sono state valutate le differenze tra i due gruppi di individui a livello di phylum, classe, ordine, famiglia e genere.

A livello di Phylum, l’analisi ha rivelato che l’84,42% delle sequenze nei CRC ed il 92,81% delle sequenze nei CM appartenevano a tre phyla: *Bacteroidetes* (34,95% nei CRC vs 35,96% nei CM), *Firmicutes* (33,69% nei CRC vs 31,13% nei CM) e *Proteobacteria* (15,78% nei CRC vs 25,72% nei CM). Per i tre phyla precedentemente indicati non si sono osservate differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti ma confrontando le sequenze appartenenti a tutti i phyla riscontrati nei campioni abbiamo registrato una significatività per il phylum *Fusobacteria* (Figura 15) che appare più abbondante nei campioni tissutali dei pazienti con CRC (9,55% vs 0,23% nei CM,  $p < 0,05$ ).

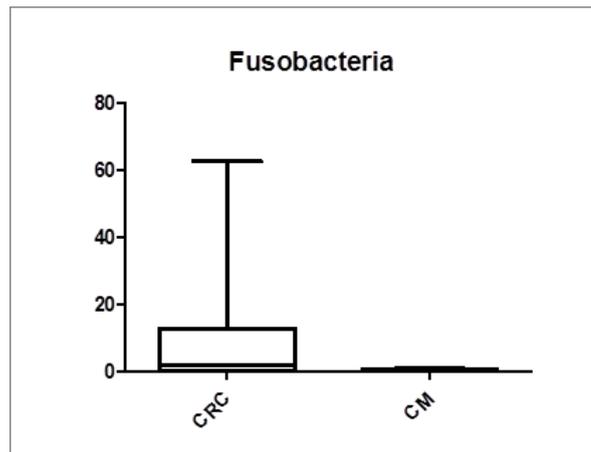
A livello di Classe, nei tessuti dei pazienti con CRC e dei CM le sequenze più abbondanti appartenevano a: *Bacteroidia* (33,85% nei CRC vs 35,19% nei CM), *Clostridia* (26,66% nei CRC vs 25,26% nei CM) e *Gammaproteobacteria* (10,92% nei CRC vs 21,31% nei CM) ma a riguardo di queste tre classi non sono emerse differenze significative tra i pazienti CRC e nei CM. L’analisi di tutte le sequenze ha mostrato a livello di Classe un aumento significativo nei tessuti dei pazienti con CRC rispetto ai CM di: *Opitutae* (0,06% nei CRC vs 0% nei CM,  $p < 0,05$ ) *Fusobacteriia* (9,55% nei CRC vs 0,23% nei CM,  $p < 0,05$ ), *Synergistia* (0,08% nei CRC vs 0,1% nei CM,  $p < 0,05$ ), *Epsilonproteobacteria* (0,63% nei CRC vs 0,01% nei CM,  $p < 0,05$ ); (Figura 16 A).

A livello di Ordine l’analisi tassonomica ha mostrato nei pazienti con CRC e nei CM prevalenza di sequenze appartenenti a *Bacteroidales* (33,85% nei CRC vs 35,19%) e *Clostridiales* (26,63% nei CRC vs 25,24%). Un terzo ordine è risultato abbondante nei campioni tissutali, nei CRC è stato l’ordine dei *Fusobacteriales* (9,55%) mentre nei CM è stato l’ordine degli *Enterobacteriales* (17,28%). Il confronto delle sequenze a livello di Ordine ha mostrato differenze tra i tessuti dei due gruppi di individui in studio: *Campylobacterales* (0,63% nei CRC vs 0,01 nei CM,  $p < 0,05$ ), e *Fusobacteriales* (9,55% nei CRC vs 0,23% nei CM,  $p < 0,05$ ) sono risultati più abbondanti nei campioni dei CRC

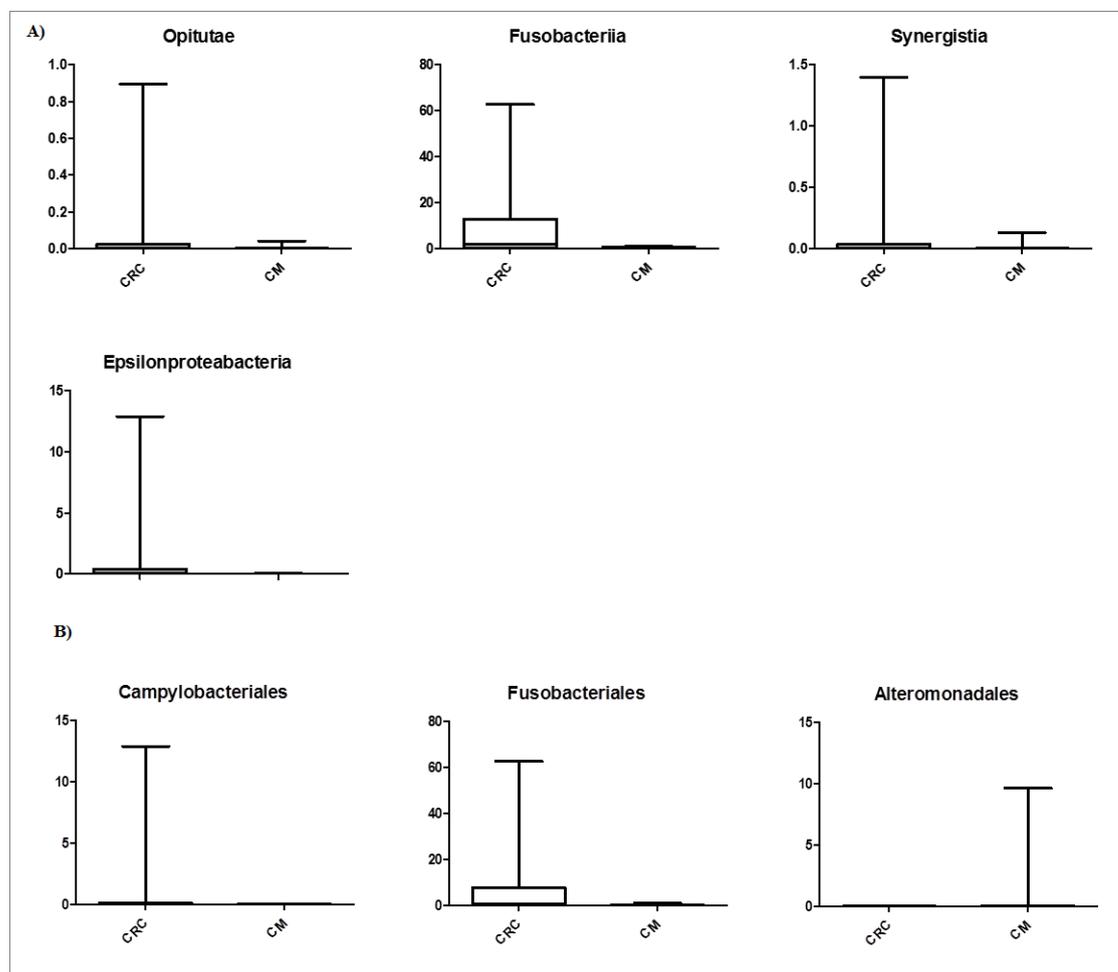
mentre *Alteromonadales* (0% nei CRC vs 0,73% nei CM,  $p < 0,05$ ) è risultato più abbondante nei campioni dei CM (Figura 16 B).

A livello di Famiglia nei campioni tissutali dei pazienti con CRC le sequenze maggiormente riscontrate appartenevano a *Bacteroidaceae* (19,17%), *Lachnospiraceae* (12,29%), *Ruminococcaceae* (9,11%) e *Fusobacteriaceae* (9,03%) mentre nei campioni dei CM il 18,80% delle sequenze appartenevano a *Bacteroidaceae*, il 12,85% a *Lachnospiraceae*, il 17,28% ad *Enterobacteriaceae* e il 9,36% a *Ruminococcaceae*. L'analisi di tutte le sequenze ha mostrato differenze tra i due gruppi: nei tessuti dei pazienti con CRC le famiglie *Leptotrichiaceae* (0,52% nei CRC vs 0,05% nei CM,  $p < 0,05$ ), *Fusobacteriaceae* (9,03% nei CRC vs 0,18 nei CM,  $p < 0,05$ ), *Planctomycetaceae* (0,09% nei CRC vs 0% nei CM,  $p < 0,05$ ), *Campylobacteraceae* (0,62% nei CRC vs 0,01% nei CM,  $p < 0,05$ ) e *Synergistaceae* (0,08% nei CRC vs 0,01 nei CM,  $p < 0,05$ ) sono risultate più abbondanti che nei tessuti dei CM; *Pseudomonadaceae* (0,09% nei CRC vs 1,06% nei CM,  $p < 0,05$ ) è risultata meno abbondante che nei tessuti dei CM (Figura 17).

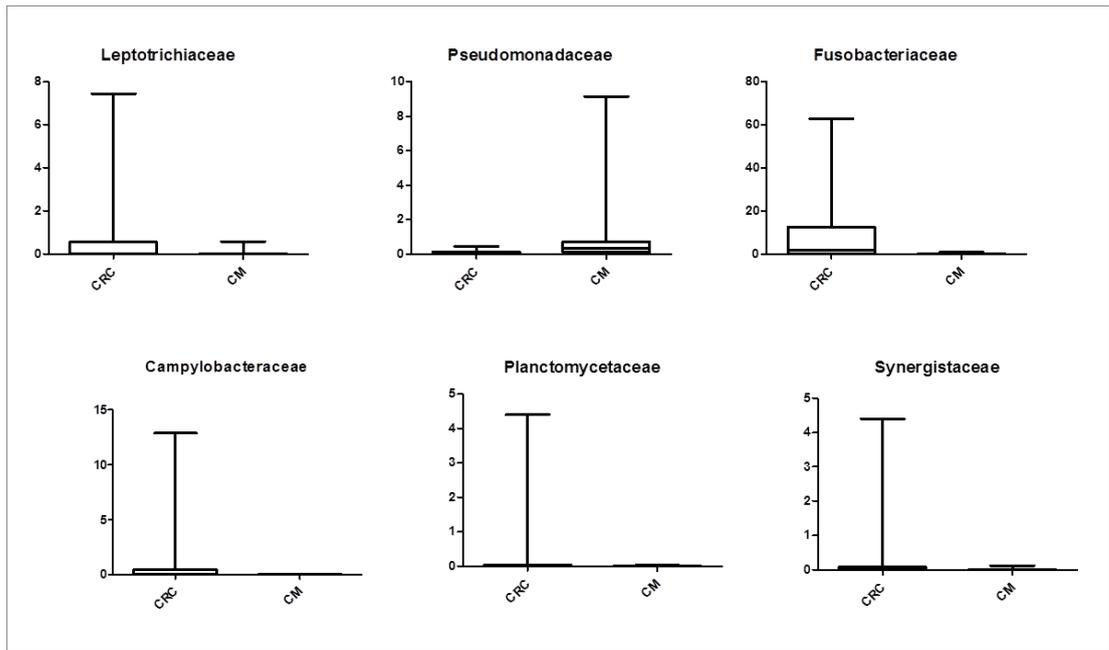
A livello di Genere nei campioni dei pazienti CRC sono risultate più abbondanti le sequenze di *Bacteroides* (19,17%), *Escherichia/Shigella* (7,34%) e *Fusobacterium* (9,03%) mentre nei campioni dei CM, i Generi più rappresentativi sono stati *Bacteroides* (18,80%), *Escherichia/Shigella* (13,25%) e *Prevotella* (5,88%). Significatività sono emerse tra i due gruppi di pazienti confrontando tutte le sequenze a livello di Genere: nei tessuti dei pazienti CRC *Campylobacter* (0,62% nei CRC vs 0,01 nei CM,  $p < 0,05$ ), *Rheinheimera* (0,02% nei CRC vs 0,12 nei CM,  $p < 0,05$ ), *Anaerotruncus* (0,04% nei CRC vs 0% nei CM,  $p < 0,05$ ), *Fusobacterium* (9,03% nei CRC vs 0,18% nei CM) e *Leptotrichia* (0,52% nei CRC vs 0,05% nei CM,  $p < 0,05$ ) sono risultati più abbondanti rispetto ai tessuti CM mentre *Mesorhizobium* (0,05% nei CRC vs 0,09% nei CM) e *Pseudomonas* (0,08% nei CRC vs 1,05% nei CM,  $p < 0,05$ ) sono risultati maggiori nei tessuti dei pazienti CM (Figura 18).



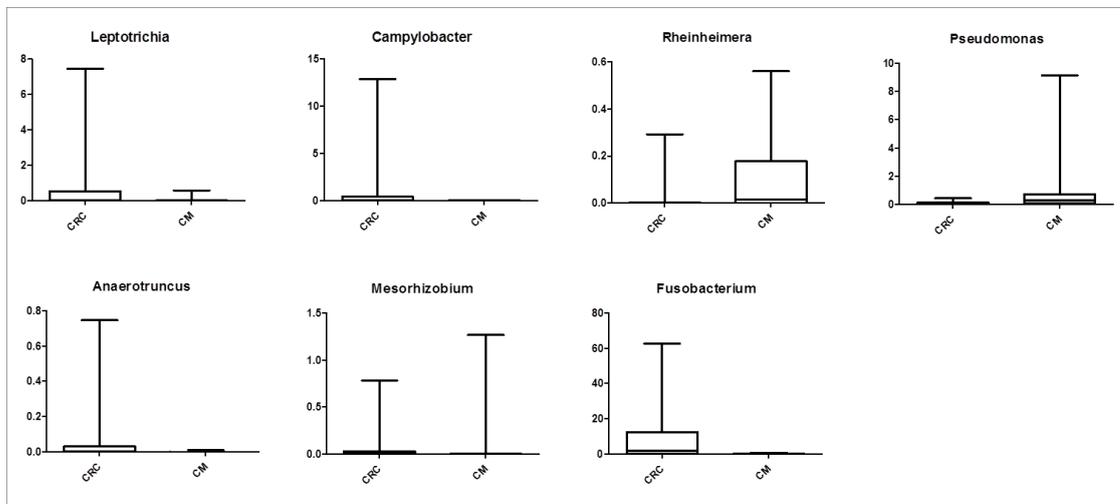
**Figura 15.** Box plot che mostra l'abbondanza associata ad una differenza significativa tra pazienti con CRC e CM del phylum *Fusobacteria*.



**Figura 16.** Box plots che mostrano l'abbondanza associata ad una differenza significativa tra pazienti con CRC e CM a livello di **A)** classe di *Oritutae*, *Fusobacteriia*, *Synergistia*, *Epsilonproteobacteria* **B)** ordine di *Campylobacteriales*, *Fusobacteriales* ed *Alteromonadales*.



**Figura 17.** Box plots che mostrano l'abbondanza associata ad una differenza significativa tra pazienti con CRC e CM a livello delle famiglie *Leptotrichiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Campylobacteraceae*, *Planctomycetaceae* e *Synergistaceae*.



**Figura 18.** Box plots che mostrano l'abbondanza associata ad una differenza significativa tra pazienti con CRC e CM a livello dei generi *Leptotrichia*, *Campylobacter*, *Rheinheimera*, *Pseudomonas*, *Anaerotruncus*, *Mesorhizobium*, *Fusobacterium*.

#### **4.1.5 Discussione**

Vista l'importanza del sistema immunitario in ambito neoplastico e le ipotesi a riguardo di un possibile coinvolgimento del microbiota nella tumorigenesi (Zitvogel *et al*, 2016; Russell *et al*, 2010) in questo studio abbiamo scelto di analizzare il microbiota intestinale, la risposta intratumorale linfocitaria T e la risposta immunitaria a livello del sangue periferico di pazienti con CRC.

Per lo studio sono stati arruolati, oltre ai pazienti con CRC, controlli di malattia affetti da poliposi intestinale al fine di osservare differenze e similarità con i pazienti CRC che potrebbero rivelarsi elementi predittivi della patologia tumorale.

Sulla base di queste osservazioni abbiamo effettuato la caratterizzazione dell'infiltrato linfocitario T presente a livello periferico ed a livello tissutale dei pazienti con CRC e dei CM.

I tessuti prelevati dalla regione centrale del tumore dei pazienti con CRC e dalla regione poliposica dei CM sono stati processati in modo da ottenere una sospensione cellulare idonea all'analisi citofluorimetrica.

L'analisi delle cellule ottenute dai tessuti ha mostrato nei due gruppi di pazienti una prevalenza di linfociti con fenotipo CD4<sup>+</sup> (58,03% CD4<sup>+</sup> vs 17,42% CD8<sup>+</sup> nei CRC; 60,15% CD4<sup>+</sup> vs 12,09% CD8<sup>+</sup> nei CM), ed a riguardo dei linfociti T con fenotipo CD8<sup>+</sup>, è emersa una percentuale maggiore nel tessuto tumorale rispetto ai tessuti dei CM.

Analizzando il profilo citochinico delle sottopopolazioni linfocitarie T rilevate nei tessuti dei pazienti con CRC e nei CM, è stata osservata una maggioranza di linfociti T produttori IFN- $\gamma$ : 46,39% Th1 e 52,87% Tc1 nei CRC; 45,05% Th1 e 40,03% Tc1 nei CM. L'abbondanza a livello tissutale di tali sottopopolazioni indica nei due gruppi di pazienti la presenza di uno stato infiammatorio che si presenta più marcato nei pazienti con CRC. L'aumento delle sottopopolazioni Th1 e Tc1 nei pazienti tumorali ci fa ipotizzare un tentativo da parte del sistema immunitario di proteggere l'individuo dalla neoplasia in accordo con i numerosi dati presenti in letteratura che indicano le proprietà citotossiche di queste sottopopolazioni (Quezada *et al*, 2010; Palucka *et al*, 2012; Corthay *et al*, 2005; Rotondi *et al*, 2003; Nishikawa *et al*, 2005; Caretto *et al* 2010; Zaidi *et al*, 2011; Takeda *et al*, 2002; Chin *et al*, 1997; Xu *et al*, 1998; Meng *et al*, 2001; Beatty *et al*, 2001).

Le sottopopolazioni Th1 e Tc1 non sono state le sole sottopopolazioni riscontrate capaci di produrre IFN- $\gamma$ , negli infiltrati linfocitari T analizzati infatti sono emerse

sottopopolazioni coproducenti IFN- $\gamma$  e IL-17: 3,64% Th1/Th17 e 6,25% Tc1/Tc17 nei CRC; 1,97% Th1/Th17, 1,20% Tc1/17 nei CM.

I dati mostrano un aumento (che risulta essere significativo a carico della sottopopolazione Tc1/Tc17) di tali sottopopolazioni nei tessuti neoplastici dove l'IL-17 potrebbe contribuire alla lotta al tumore. Purtroppo, ad oggi, dati certi sul ruolo della IL-17 in ambito tumorale non ci sono ancora: studi presenti in letteratura descrivono un ruolo pro-tumorale della citochina (Wu *et al*, 2009; Wang *et al*, 2009; Numasaki *et al*, 2003; Takahashi *et al*, 2005; Lee *et al*, 2008) mentre altri studi descrivono il ruolo opposto (Wilke *et al*, 2011; Kryczek *et al*, 2009).

Nell'infiltrato linfocitario T inoltre molte altre sottopopolazioni sono state riscontrate: sottopopolazioni producenti solamente la IL-17 (Th17-Tc17), o la IL-4 (Th2-Tc2), o la IL-22 (Th22-Tc22), o la IL-9 (Th9/Tc9) o solamante la IL-10 (Treg-Tcreg).

Le sottopopolazioni Th17 e Tc17 si sono osservate nei due gruppi di pazienti nelle seguenti percentuali: 7,01% Th17 nei CRC vs 7,26% nei CM; 6,33% Tc17 nei CRC vs 2,12% nei CM con p value < 0,05. Le percentuali molto simili di Th17 nei tessuti appartenenti ai due gruppi di pazienti in esame ci fanno pensare al coinvolgimento di questa sottopopolazione nell'infiammazione cronica che caratterizza le due patologie ma non ad un coinvolgimento in ambito neoplastico che ci viene invece suggerito dalla differenza statisticamente significativa emersa a carico della sottopopolazione Tc17.

A riguardo delle sottopopolazioni linfocitarie T producenti IL-4, IL-9, IL-22 ed IL-10 si sono registrate differenze tra i due gruppi: per i linfociti Thelper nei tessuti dei pazienti con CRC si sono osservate percentuali maggiori di Th2, Th9 e Treg (3,02% Th2 nei CRC vs 1,05% nei CM con p < 0,05; 1,84% Th9 nei CRC vs 0,98% nei CM; 3,75% Treg nei CRC vs 1,21% nei CM con p < 0,05) e minori di Th22 (2,00% nei CRC vs 4,02% nei CM) con significatività statistica a riguardo dei Th2 e Treg; per i linfociti Tcitotossici non si sono registrati linfociti Tcreg nei tessuti e le sottopopolazioni Tc2, Tc22, Tc9 (4,60% Tc2 nei CRC vs 8,37% nei CM, p < 0,05; 4,20% Tc22 nei CRC vs 6,64% nei CM; 1,84% Tc9 nei CRC vs 2,03% nei CM) sono risultate minori nei tessuti dei CRC con significatività statistica per la sottopopolazione Tc2. L'aumento significativo nei tessuti neoplastici dei linfociti Th2 e Treg è in linea con la letteratura dove tali linfociti T sono descritti coinvolti nella carcinogenesi e nella progressione tumorale (Ochi *et al*, 2012; Tatsumi *et al*, 2002; Taga *et al*, 1993; Vicari *et al*, 2004; O'Garra *et al*, 2009; Moore *et al*, 2001; Seo *et al*, 2002) ed, inoltre, non stupisce la maggiore percentuale di Th22, Tc2

e Tc22 nello stato di poliposi dove tali citochine prodotte sono coinvolte nell'omeostasi tissutale.

La risposta linfocitaria T è stata caratterizzata anche a livello del sangue periferico nei pazienti con CRC e nei CM. Come era stato osservato a livello tissutale, anche a livello periferico le percentuali di linfociti T con fenotipo CD4<sup>+</sup> sono risultate maggiori rispetto alle percentuali dei linfociti con fenotipo CD8<sup>+</sup> sia nei pazienti con CRC che nei CM (51,39% CD4<sup>+</sup> vs 15,15% CD8<sup>+</sup> nei CRC; 56,45% CD4<sup>+</sup> vs 11,57% CD8<sup>+</sup> nei CM). Le percentuali di linfociti T CD8<sup>+</sup> anche nel sangue sono emerse percentuali maggiori nei pazienti tumorali rispetto ai controlli di malattia.

Le sottopopolazioni linfocitarie T presenti a livello periferico sono state registrate in percentuali molto più basse rispetto alle percentuali rilevate nei tessuti: anche qui le sottopopolazioni più abbondanti risultano quelle producenti IFN- $\gamma$  (13,75% Th1 e 57,45% Tc1 nei CRC vs 18,07% Th1 e 32,62% Tc1 nei CM) con differenza significativa tra i due gruppi a carico dei Tc1, ed a seguire le sottopopolazioni Th2 (0,67% nei CRC vs 2,11% nei CM;  $p < 0,05$ ) e Tc2 (0,28% nei CRC vs 5,21% nei CM;  $p < 0,05$ ) che risultano aumentate nei CM.

Vista la scarsa quantità di informazioni ottenuta sulle sottopopolazioni linfocitarie T circolanti, si può dedurre che la valutazione a livello tissutale resta il miglior metodo di indagine.

A livello periferico, al fine di ottenere maggiori informazioni sulla risposta immune, è stato effettuato il dosaggio di 27 citochine infiammatorie (MIP1 $\alpha$ , IL27, IL1b, IL2, IL4, IL5, IP10, IL6, IL8, IL10, IL12p70, IL13, IL17 $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , MCP1, IL9, P-selectin, IL1 $\alpha$ , IL23, IL18, IL21, sICAM-1, IL22, E-selectin) che ha permesso di avere un'analisi molecolare della risposta immunitaria nei pazienti con CRC e nei CM. L'analisi non ha mostrato differenze significative tra il gruppo dei pazienti tumorali ed i controlli di malattia ma ha comunque evidenziato una quantità totale di citochine minore in corso di CRC che ci fa pensare ad uno stato di immunosoppressione periferica nei pazienti. I dati relativi ai pazienti CRC ed ai CM sono inoltre stati confrontati con i valori delle citochine riscontrati in un gruppo di soggetti sani: l'analisi ha mostrato sia nei pazienti CRC che CM una quantità di citochine totali diminuita rispetto ai HS ma differenze significative si sono registrate solo per i CRC a carico delle citochine: TNF $\alpha$  ( $p = 0,0002$ ), IFN $\alpha$ , ( $p = 0,0069$ ), IFN $\gamma$  ( $p = 0,0022$ ), IL13 ( $p = 0,0002$ ), IL17A ( $p = 0,0145$ ), IL4 ( $p = 0,0004$ ) e delle citochine regolatorie: IL-21 ( $p = 0,0114$ ) e IL-27 ( $p =$

0,0307). Tali dati sembrano confermare un sistema immunitario compromesso nei pazienti con neoplasia.

A riguardo del microbiota, abbiamo condotto uno studio preliminare al fine di definire e standardizzare i protocolli di analisi sperimentali, esplorando, caratterizzando e confrontando le comunità batteriche presenti nella cavità orale e nell'intestino di pazienti con CRC e soggetti sani. Le analisi sono state effettuate su 10 campioni di tessuto tumorale e su 20 campioni salivari e 20 campioni fecali appartenenti a 10 pazienti con CRC e 10 soggetti sani. L'analisi di somiglianza, effettuata per osservare le differenze tra i vari distretti analizzati e tra i due gruppi di individui in esame, ha mostrato differenze in termini di comunità batterica tra i vari distretti ( $R = 0,834$ ,  $p = 0,001$ ) e differenze tra i campioni fecali dei pazienti con CRC ed i soggetti sani ( $R = 0,201$ ,  $p = 0,005$ ). L'analisi discriminante lineare ha rivelato una distinta distribuzione microbica rispetto ai siti di campionamento: i campioni di saliva hanno mostrato principalmente membri di *Actinobacteria*, *Saccharibacteria*, *Betaproteobacteria*, *Fusobacteria*, *Firmicutes* (principalmente *Negativicutes* and *Bacilli*) e *Bacteroidetes* (rappresentati esclusivamente dai membri della classe *Flavobacteriia* e della famiglia *Prevotellaceae*); i campioni fecali presentavano una distribuzione caratteristica di *Bacteroidetes* (in particolare la classe *Bacteroidia*) e *Firmicutes* (principalmente classi *Clostridia* ed *Erysipelotrichia*); i campioni tissutali erano principalmente caratterizzati da membri di *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Planctomycetes* e *Firmicutes* (famiglia *Lachnospiraceae* e *Clostridiales XI*) e da abbondanza di *Fusobacterium*.

Tali risultati, anche se presentano delle limitazioni dettate dalla casistica ristretta dello studio e dalla mancata caratterizzazione tassonomica a livello di specie, portano ad affermare che nonostante sia nota l'influenza del microbiota salivare su quello intestinale la composizione batterica da noi riscontrata nei due distretti risulta diversa, ed inoltre, la saliva non sembra essere un campione utile all'individuazione di biomarkers microbioci associabili al CRC in quanto non presenta differenze statisticamente significative con i soggetti sani. Le differenze invece riscontrate tra le feci dei pazienti con CRC e le feci dei soggetti sani portano ad ipotizzare la presenza di comunità batteriche potenzialmente correlate con il CRC.

Inoltre, lo studio preliminare ha mostrato nelle biopsie tumorali una composizione microbica caratteristica e differente da quella presente nel lume intestinale (feci) e questo

ha spinto ad effettuare il secondo studio riguardante la caratterizzazione del microbiota tissutale e fecale nei pazienti con CRC e nei pazienti affetti con poliposi intestinale.

Al momento i dati relativi ai campioni fecali, a causa problemi riscontrati durante la fase di sequenziamento, sono ancora in elaborazione ma già dall'analisi condotta sui campioni tissutali dei pazienti con CRC e poliposi sono emerse informazioni importanti. L'analisi di somiglianza effettuata confrontando i dati relativi ai tessuti tumorali con i dati dei tessuti poliposici, ha mostrato differenze nei vari livelli tassonomici.

A livello di Phylum si osserva nei tessuti dei pazienti con CRC un aumento significativo di *Fusobacteria* (9,55% vs 0,23% nei CM,  $p < 0,05$ ); a livello di Classe si osserva un aumento di *Opitutae* (0,06% nei CRC vs 0% nei CM,  $p < 0,05$ ) *Fusobacteriia* (9,55% nei CRC vs 0,23% nei CM,  $p < 0,05$ ), *Synergistia* (0,08% nei CRC vs 0,1% nei CM,  $p < 0,05$ ), *Epsilonproteobacteria* (0,63% nei CRC vs 0,01% nei CM,  $p < 0,05$ ); a livello di Ordine si ha un aumento nei CRC di *Campylobacterales* (0,63% nei CRC vs 0,01 nei CM,  $p < 0,05$ ) e *Fusobacteriales* (9,55% nei CRC vs 0,23% nei CM,  $p < 0,05$ ) ed una minore abbondanza di *Alteromonadales* (0% nei CRC vs 0,73% nei CM,  $p < 0,05$ ); a livello di Famiglia nei tessuti dei pazienti con CRC le famiglie *Leptotrichiaceae* (0,52% nei CRC vs 0,05% nei CM,  $p < 0,05$ ), *Fusobacteriaceae* (9,03% nei CRC vs 0,18 nei CM,  $p < 0,05$ ), *Planctomycetaceae* (0,09% nei CRC vs 0% nei CM,  $p < 0,05$ ), *Campylobacteraceae* (0,62% nei CRC vs 0,01% nei CM,  $p < 0,05$ ) e *Synergistaceae* (0,08% nei CRC vs 0,01 nei CM,  $p < 0,05$ ) sono risultate più abbondanti che nei tessuti dei CM mentre *Pseudomonadaceae* (0,09% nei CRC vs 1,06% nei CM,  $p < 0,05$ ) è risultata meno abbondante che nei tessuti dei CM; a livello di Genere nei tessuti dei pazienti CRC *Campylobacter* (0,62% nei CRC vs 0,01 nei CM,  $p < 0,05$ ), *Rheinheimera* (0,02% nei CRC vs 0,12 nei CM,  $p < 0,05$ ), *Anaerotruncus* (0,04% nei CRC vs 0% nei CM,  $p < 0,05$ ), *Fusobacterium* (9,03% nei CRC vs 0,18% nei CM) e *Leptotrichia* (0,52% nei CRC vs 0,05% nei CM,  $p < 0,05$ ) sono risultati più abbondanti rispetto ai tessuti CM mentre *Mesorhizobium* (0,05% nei CRC vs 0,09% nei CM) e *Pseudomonas* (0,08% nei CRC vs 1,05% nei CM,  $p < 0,05$ ) sono risultati meno presenti. Nonostante siano numerose le differenze significative tra i due gruppi di pazienti, le abbondanze nettamente differenti si osservano ad ogni livello tassonomico a carico dei Fusobatteri. Tale dato conferma quanto presente in letteratura, ovvero lo stretto legame tra il *Fusobacterium nucleatum* ed il CRC: tale microrganismo sembra coinvolto nella carcinogenesi del CRC per la capacità di indurre la proliferazione delle cellule epiteliali determinando un microambiente proinfiammatorio che favorisce la proliferazione cellulare, la disseminazione delle cellule

neoplastiche, l'aggressività tumorale (Rubinstein *et al*, 2013); per la produzione della lectina Fap2 che è in grado di bloccare l'attività antitumorale citotossica delle cellule T e NK (Mima *et al*, 2015; Gur *et al*, 2015).

## ***4.2 Analisi della risposta immunitaria e del microbiota intestinale nei pazienti con celiachia***

In questa parte dello studio è stata effettuata la caratterizzazione dell'infiltrato linfocitario T presente a livello della mucosa intestinale di pazienti con malattia celiaca (MC), l'analisi molecolare della risposta immune presente a livello del sangue periferico e la valutazione del microbiota intestinale in tali pazienti.

Il reclutamento dei pazienti ha portato ad avere una casistica costituita da 52 individui: 22 pazienti con MC e 30 controlli di malattia affetti da celiachia potenziale (MCP).

In una prima fase dello studio, ci sono stati forniti campioni di mucosa intestinale prelevati da 22 pazienti arruolati (purtroppo non è stato possibile ricevere i campioni da tutti i pazienti dello studio in quanto, molti di loro, avevano già effettuato in altra sede ospedaliera una gastroduodenoscopia mirata alla diagnosi della patologia celiaca e non era eticamente corretto sottoporli di nuovo all'esame endoscopico (solo ai fini delle nostre analisi), ed a seguito dell'esame istologico, i 22 pazienti sono risultati: 14 pazienti celiaci ed 8 celiaci potenziali. I campioni tissutali sono stati dissociati e le cellule T ottenute sono state clonate ed espanse in coltura in modo da poter valutare le sottopopolazioni linfocitarie presenti.

Nella seconda parte dello studio, campioni ematici ottenuti dai pazienti con MC e con MCP sono stati processati in modo da recuperare il siero su cui effettuare l'analisi delle citochine infiammatorie circolanti.

Infine, campioni fecali dei pazienti sono stati processati al fine di isolare il DNA batterico necessario per effettuare l'analisi del microbiota intestinale.

#### ***4.2.1 Analisi ex vivo dell'infiltrato linfocitario T nei pazienti con MC***

Per valutare e confrontare la risposta immune presente a livello della mucosa intestinale nei pazienti con MC e nei controlli con MCP, i campioni di mucosa sono stati dissociati e le cellule ottenute sono state clonate ed espanse in coltura in modo da isolare i Tcc. Le colture cellulari effettuate, hanno portato ad ottenere complessivamente 267 Tcc, di cui 206 sono derivati dalle colture cellulari dei pazienti con MC e 61 dalle colture dei pazienti con MCP.

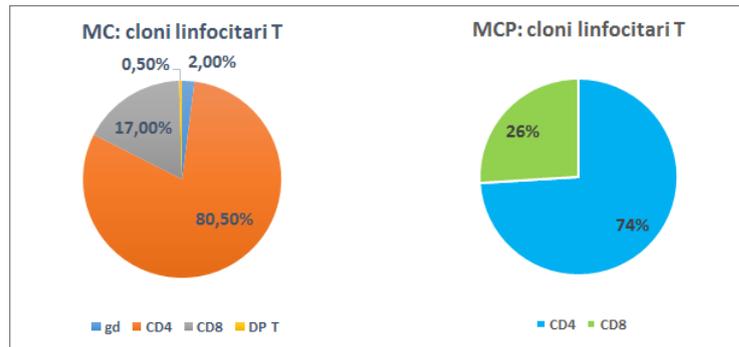
I 267 cloni T ottenuti sono stati caratterizzati per l'espressione di CD4 e CD8 e l'analisi fenotipica ha mostrato, sia nei pazienti con MC che MCP, una prevalenza di cloni CD4<sup>+</sup> rispetto ai cloni CD8<sup>+</sup>. In particolare, dei 206 Tcc ottenuti dai pazienti con MC, 166 (80,5%) erano cloni Thelper, 35 (17%) erano cloni Tcitotossici, 4 erano cloni esprimenti  $\gamma\delta$  (gd, 2%) e 1 clone esprimeva sia il CD4<sup>+</sup> che il CD8<sup>+</sup> (clone definito doppio positivo, DP T); dei 61 Tcc ottenuti dai pazienti con MCP, 45 (74%) erano cloni CD4<sup>+</sup> e 16 (26%) erano cloni CD8<sup>+</sup> (Figura 19).

Per caratterizzare il profilo funzionale dei cloni, sono state analizzate tramite test ELISA le citochine IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, e IL-10 e, in base all'espressione dei marcatori extracellulari ed in base alle citochine prodotte, i cloni sono stati classificati in: Th1-Tc1, Th2-Tc2, Th0-Tc0, Th17-Tc17, Th1/Th17-Tc1/Tc17, Th0/Th17-Tc0/Tc17 (producevano IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17), Treg-Tcreg,  $\gamma\delta$  1 (cloni  $\gamma\delta$  produttori IFN- $\gamma$ ), DP T IFN- $\gamma$ /IL-17 (clone doppio positivo produttore IFN- $\gamma$  e IL-17).

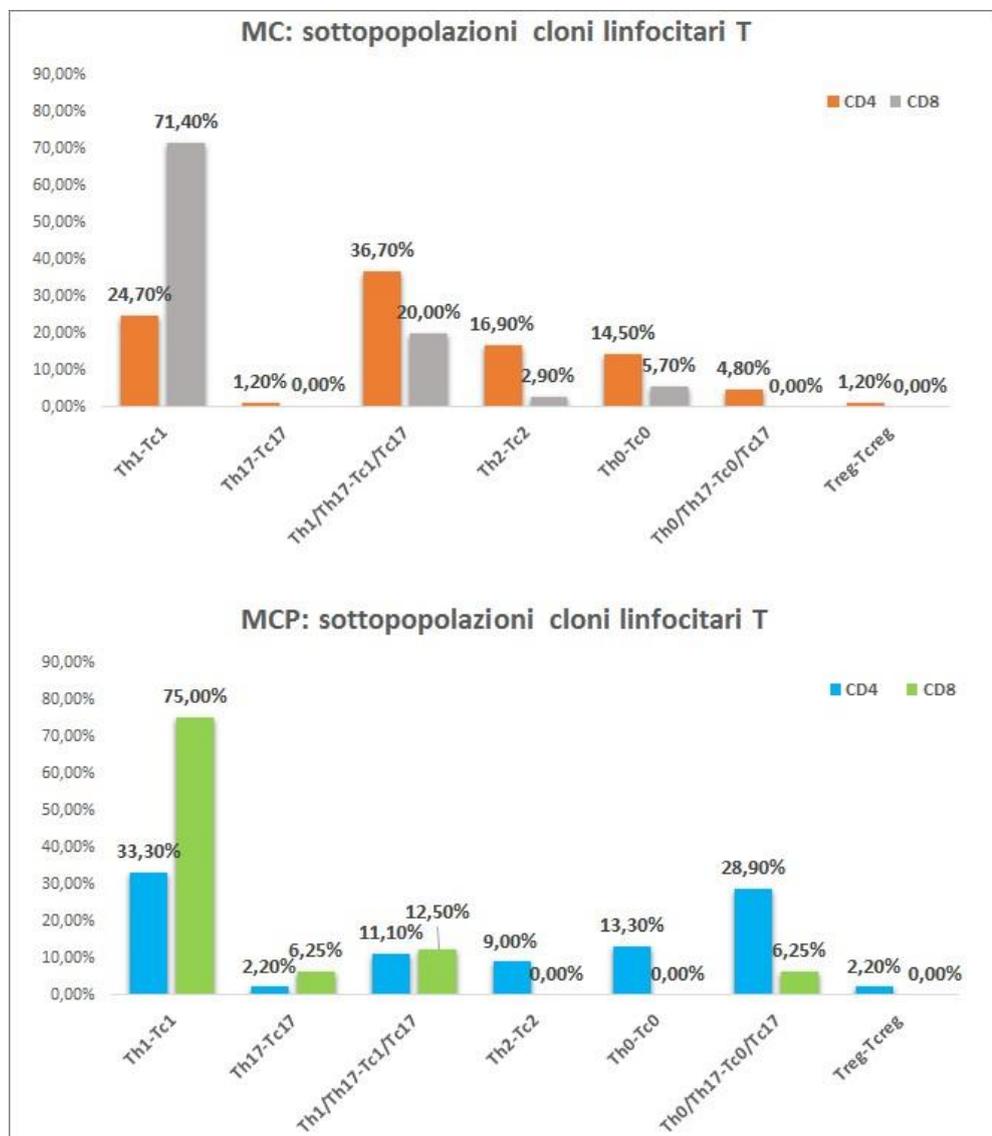
Dalle analisi svolte, nei pazienti con MC i cloni T CD4<sup>+</sup> sono risultati principalmente capaci di produrre IFN- $\gamma$  da solo o in combinazione con le altre citochine analizzate (24,7% Th1, 36,7% Th1/Th17, 14,5% Th0, 4,8% Tho/Th17) e sono emerse percentuali di cloni produttori la sola IL-17 (1,2% Th17), IL-4 (16,9% Th2) ed IL-10 (1,2% Treg); i cloni CD8<sup>+</sup> sono risultati per la maggioranza capaci di produrre IFN- $\gamma$  (71,4% Tc1, 20% Tc1/Tc17, 5,7% Tc0) e si è registrata una percentuale di cloni produttori IL-4 (2,95% Tc2) (Figura 20); i 4 cloni T  $\gamma\delta$  producevano tutti IFN- $\gamma$  mentre il clone DP T coproduceva IFN- $\gamma$  ed IL-17.

A riguardo invece dei pazienti con MCP, è stata rilevata tra i cloni T CD4<sup>+</sup> una prevalenza di cloni T produttori IFN- $\gamma$  da solo o in combinazione con IL-17 e/o IL-4 (33,3% Th1, 11,1% Th1/Th17, 13,3% Th0, 28,9% Tho/Th17). Inoltre, un 2,2% di cloni T è risultato Th17, il 9% Th2 e abbiamo rilevato un 2,2% di cloni Treg. Tra i cloni T CD8<sup>+</sup> una

percentuale del 75% di cloni erano Tc1, 12,5% Tc1/Tc17, 6,25% Tc0/Tc17, 6,25% Tc17 (Figura 20).



**Figura 19.** Distribuzione (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) dei Tcc ottenuti per espansione dai campioni tissutali dei pazienti con MC e con MCP.



**Figura 20.** Profilo fenotipico (pattern citochinico) dei Tcc ottenuti per espansione dai campioni tissutali dei pazienti con MC e con MCP.

#### ***4.2.2 Analisi molecolare della risposta immunitaria nei pazienti con MC***

Per l'analisi molecolare della risposta immunitaria nei pazienti con MC, è stato dosato lo stesso pannello di 27 citochine infiammatorie (MIP1 $\alpha$ , IL27, IL1b, IL2, IL4, IL5, IP10, IL6 IL8, IL10, IL12p70, IL13, IL17 $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , MCP1, IL9, P-selectin, IL1 $\alpha$ , IL23, IL18, IL21, sICAM-1, IL22, E-selectin) utilizzato nello studio del CRC.

Il dosaggio è stato effettuato in tutti i campioni sierici dei pazienti arruolati per lo studio ed in 12 campioni sierologici di individui non aventi patologie (gli stessi controlli sani dello studio CRC) (Figura 21, Figura 22).

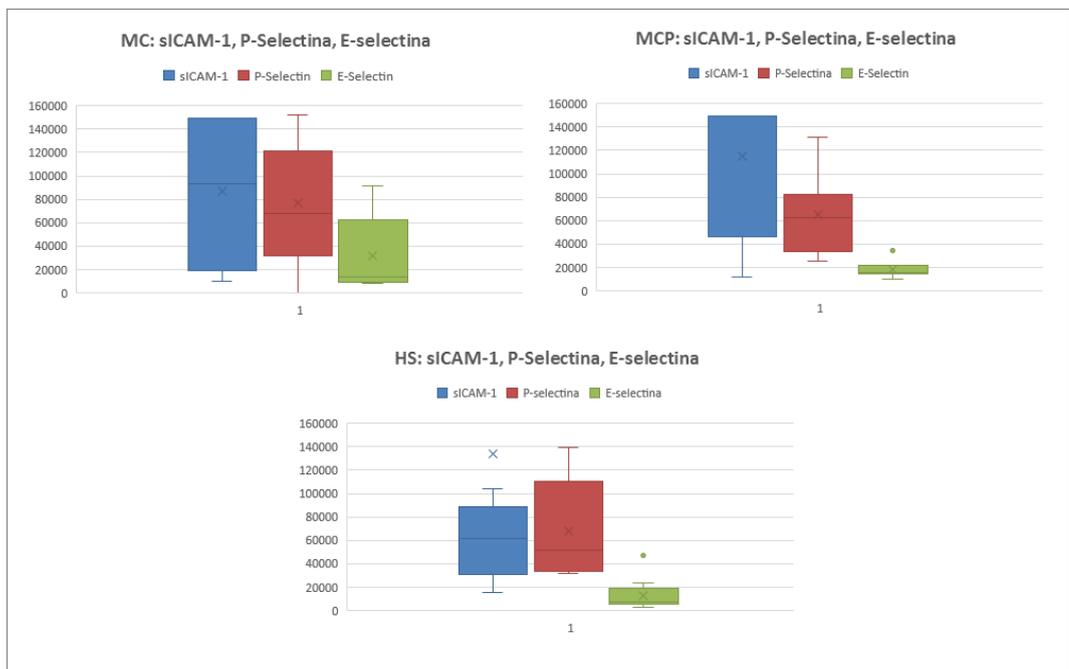
Confrontando la quantità media di citochine totali riscontrata nei pazienti con MC con la quantità rilevata nei pazienti con MCP, è emersa una quantità di citochine totali maggiore nei pazienti con MC rispetto ai controlli di malattia e minore rispetto ai soggetti sani.

L'analisi statistica dei dati non ha però mostrato differenze significative tra il gruppo di pazienti celiaci ed il gruppo di pazienti celiaci potenziali ma ha evidenziato significatività confrontando separatamente i due gruppi di pazienti con i soggetti sani.

Nei pazienti celiaci, rispetto ai HS, nonostante la quantità di citochine totali fosse minore, è emerso un aumento significativo delle citochine pro-infiammatorie IFN- $\gamma$  (p=0,0010), IL-18 (p=0,0061), TNF- $\alpha$  (0,0338), IL-17 (p=0,0019), IL-21 (p=0,0161), IL12p70 (p=0,0266) e della citochina anti-infiammatoria IL-4 (p=0,0098) mentre, nei pazienti con MCP, ad essere risultate significativamente aumentate sono state le citochine IFN- $\gamma$  (p=0,0008), IL-18 (p=0,0150), IL-17 (p=0,0145). Inoltre, nei pazienti con MCP si è riscontrata una diminuzione della citochina antinfiammatoria IL-13 (p=0,0184).



**Figura 21.** Livelli sierici di 24 citochine riscontrate nei pazienti con MC, MCP e nei HS.



**Figura 22.** Livelli sierici delle citochine E-selectina, P-Selectina e sICAM-1 riscontrate nei pazienti con MC, MCP e nei HS.

### **4.2.3 Discussione**

Nella patogenesi della malattia celiaca il sistema immunitario è determinante: è lui stesso ad innescare, conseguentemente all'ingestione di glutine, il danno a livello dell'epitelio intestinale in individui che presentano una predisposizione genetica alla malattia. Nei soggetti celiaci peptidi delle prolamine del glutine innescano una reazione immunitaria che vede coinvolti i linfociti Thelper ed i linfociti B. Il legame dei peptidi con l'HLA presente su cellule presentanti l'antigene viene riconosciuto dai linfociti Thelper presenti nella lamina propria intestinale dei pazienti e si ha attivazione linfocitaria con conseguente rilascio di citochine pro-infiammatorie (IFN- $\gamma$ , IL-21, IL-17). Le citochine secrete determinano, oltre ad infiammazione a livello intestinale, attivazione di linfociti B con conseguente secrezione di anticorpi anti-gliadina, anti-endomisio ed anti-transglutaminasi tissutale e rimodellamento tissutale per stimolazione di fibroblasti e cellule infiammatorie. Inoltre, a livello intestinale si ha un aumento dell'infiltrato linfocitario intraepiteliale che, grazie alla capacità citolitica, provoca distruzione dell'epitelio con conseguente atrofia dei villi intestinali (Caio *et al*, 2019; Stammaes *et al*, 2015; Tang *et al*, 2009; Tjon *et al*, 2010; Pagliari *et al*, 2015).

Oltre ai pazienti con MC, ci sono individui che pur presentando gli anticorpi specifici della patologia e la predisposizione genetica, non mostrano lesioni istologiche a livello duodenale: tali soggetti (definiti celiaci potenziali, MCP) fanno ipotizzare la presenza di fattori, al momento sconosciuti, capaci di modulare la risposta immune alla base della malattia.

Tra i fattori potenzialmente coinvolti nella MC, si ipotizza un ruolo del microbiota intestinale, ed è per questo, che nel nostro studio abbiamo deciso di effettuare oltre all'analisi molecolare della risposta immune periferica ed all'analisi dell'infiltrato linfocitario T presente a livello della mucosa intestinale nei pazienti con MC e con MCP anche il microbiota intestinale.

Per effettuare la caratterizzazione dell'infiltrato linfocitario T presente a livello della mucosa intestinale dei pazienti con MC e con MCP, i campioni di tessuto prelevati tramite gastroduodenoscopia sono stati dissociati e le cellule T ottenute sono state clonate ed espanse in coltura. Con la clonazione il numero di Tcc ottenuti dai tessuti dei pazienti con MC (206) è risultato maggiore rispetto a quello ricavato dai tessuti dei pazienti con MCP (60), indicando un infiltrato di cellule linfocitarie T in aumento nella mucosa intestinale dei pazienti con MC. L'analisi fenotipica dei cloni ha mostrato, nei tessuti dei pazienti

con MC e con MCP, un infiltrato caratterizzato prevalentemente da cloni CD4<sup>+</sup> (166/206, 80,5% nei tessuti dei pazienti con MC; 45/60, 74% nei tessuti dei pazienti con MCP) che sono emersi in percentuale maggiore nei tessuti dei pazienti con MC. Nei pazienti con MC, è stata riscontrata anche la presenza di un clone doppio positivo CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e cloni esprimenti fenotipo  $\gamma\delta$  (4/206, 2%), ed a riguardo dei cloni T con fenotipo CD8<sup>+</sup>, la percentuale nei pazienti MC è risultata minore rispetto a quella presente nell'infiltrato dei pazienti con MCP (16/60, 26% Tc nei pazienti con MCP vs 35/206, 17% Tc nei pazienti con MC). Tali dati mostrano già delle differenze importanti tra i due gruppi di pazienti in esame: l'infiltrato linfocitario dei pazienti con MC mostra una percentuale maggiore di linfociti Thelper (di cui è noto il loro coinvolgimento nell'insorgenza del danno tissutale) e la presenza di linfociti  $\gamma\delta$  (sui quali in letteratura studi dimostrano un loro incremento nei tessuti dei pazienti con MC rispetto ai tessuti di soggetti sani; Spencer *et al*, 1991; Han *et al*, 2013). Tali differenze fanno pensare che ci sia davvero a livello intestinale un elemento diverso tra i due gruppi di pazienti che va ad innescare una reazione diversa al glutine.

Effettuando l'analisi del profilo citochinico dei cloni T è stato osservato che, in entrambe i gruppi di pazienti, l'infiltrato linfocitario era caratterizzato da cloni appartenenti a tutte le sottopopolazioni linfocitarie analizzate: Th1-Tc1, Th2-Tc2, Th0-Tc0, Th17-Tc17, Th1/Th17-Tc1/Tc17, Th0/Th17-Tc0/Tc17 (producevano IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17), Treg-Treg.

A riguardo dei linfociti Thelper presenti nei pazienti con MC, sono state osservate percentuali minori di cloni Th1 (24,7% nella MC vs 33,3% nella MCP), Th17 (1,2% nella MC vs 2,2% nella MCP), Th0/Th17 (4,8% nella MC vs 28,9% nella MCP) e Treg (1,2% nella MC vs 2,2% nella MCP) e sono emerse percentuali maggiori di linfociti Th2 (16,9% nella MC vs 9% nella MCP), Th0 (14,5% nella MC vs 13,3% nella MCP) e Th1/Th17 (36,7% nella MC vs 11,10%) rispetto ai dati relativi ai tessuti dei pazienti con MCP.

A riguardo invece dei linfociti Tcitotossici sono emerse, nei pazienti con MC, percentuali minori di cloni Tc1 (71,4% nella MC vs 75% nella MCP), Tc17 (nessun clone nella MC vs 6,25% nella MCP), Tc0/Tc17 (nessun clone nella MC vs 6,25% nella MCP) e percentuali maggiori di Tc2 (2,9% nella MC e nessun clone nella MCP), Tc0 (0,7% nella malattia vs nessun clone nella MCP) rispetto ai pazienti con MCP.

L'analisi complessiva dei dati immunologici mostra la presenza di un infiltrato linfocitario caratterizzato dalle citochine IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17 in entrambe i gruppi di pazienti ma fa anche emergere la presenza di linfociti Treg in aumento nei pazienti con

MCP. Viste le proprietà immunosoppressive dei linfociti Treg, la percentuale in aumento di quest'ultimi nella MCP potrebbe spiegare l'assenza del danno in pazienti che hanno tutti gli elementi per sviluppare la patologia.

Al fine di osservare eventuali differenze nella risposta immune periferica dei due gruppi di pazienti, è stato effettuato il dosaggio di 27 citochine infiammatorie (MIP1 $\alpha$ , IL27, IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL5, IP10, IL6, IL8, IL10, IL12p70, IL13, IL17 $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , MCP1, IL9, P-selectin, IL1 $\alpha$ , IL23, IL18, IL21, sICAM-1, IL22, E-selectin) che ha permesso di effettuare un'analisi molecolare della risposta immunitaria.

L'analisi statistica dei dati ottenuti non ha mostrato differenze significative tra il gruppo di pazienti con MC ed il gruppo di pazienti con MCP e questo ci dà conferma di quanto i due gruppi di pazienti presentino elementi a comune tra di loro.

I dati relativi ai pazienti con MC e con MCP sono inoltre stati confrontati con i valori delle citochine riscontrati in un gruppo di soggetti sani: nei pazienti celiaci, nonostante sia emersa una quantità minore di citochine totali, si è registrato un aumento significativo delle citochine pro-infiammatorie IFN $\gamma$  (p=0,0010), IL-18 (p=0,0061), TNF $\alpha$  (0,0338), IL-17 (p=0,0019), IL-21 (p=0,0161), IL12p70 (p=0,0266) e della citochina anti-infiammatoria IL-4 (p=0,0098) mentre, nei pazienti con MCP, è stato osservato un aumento significativo delle citochine IFN $\gamma$  (p=0,0008), IL-18 (p=0,0150), IL-17 (p=0,0145) ed una diminuzione della citochina anti-infiammatoria IL-13 (p=0,0184).

Tali dati mostrano uno stato di alterazione del sistema immunitario in entrambe i gruppi di pazienti che ancora una volta sottolinea l'importanza di studiare i meccanismi alla base della patologia e l'importanza di tenere sotto controllo i soggetti con MCP.

A riguardo del microbiota intestinale purtroppo a causa di un ritardo legato a problemi di sequenziamento dei campioni, i dati sono ancora in analisi ma viste le differenze tra i due gruppi di pazienti nella risposta immune è di fondamentale importanza terminare la caratterizzazione della comunità batterica presente a livello intestinale nei due gruppi di pazienti.

## **5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE**

I risultati ottenuti dalla caratterizzazione dell'infiltrato linfocitario T isolato dal tessuto tumorale e dai celiaci hanno evidenziato l'importanza del sistema immunitario nelle patologie in esame, facendo emergere differenze significative tra i pazienti e gli individui di controllo (soggetti con poliposi intestinale, CM; soggetti con malattia celiaca potenziale, MCP) utilizzati nei due studi.

Anche l'analisi della risposta immunitaria condotta a livello del sangue periferico ha fatto emergere un dato molto interessante: nonostante non siano state evidenziate differenze significative tra le condizioni patologiche confrontate, l'analisi sierologica della risposta immune ha mostrato un profilo citochinico diverso tra i soggetti sani e i pazienti con CRC, con MC e con MCP. Se aumentando la casistica dei pazienti venissero confermate le differenze molecolari osservate, si potrebbe pensare all'introduzione in diagnostica di un dosaggio di citochine su campioni di siero che potrebbe permettere, rapidamente ed in maniera non invasiva, di riconoscere individui con neoplasia, con MC e soggetti celiaci potenziali.

Riguardo l'analisi del microbiota intestinale, nonostante siano ancora in corso le analisi delle feci dei celiaci, le differenze emerse dal confronto della comunità batterica presente nei campioni fecali dei pazienti neoplastici con la componente microbica riscontrata nei nelle feci dei soggetti sani, e le differenze evidenziate tra i campioni tissutali dei pazienti con CRC e dei controlli di malattia, suggeriscono un ruolo importante dei microrganismi intestinali nell'insorgenza e nella progressione della patologia.

Sulla base dei risultati ottenuti, è sicuramente importante approfondire le analisi condotte sulla risposta immunitaria e sul microbiota intestinale, aumentando le casistiche dei due studi effettuati, ed al fine di comprendere le possibili relazioni mutualistiche tra il microbiota intestinale e la risposta immune, sarà necessario effettuare una correlazione statistica di tutti i dati ottenuti.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abrams GD, Bauer H, Sprinz H. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab Invest* 1963; 12:355-64.

Abrams GD, Bishop JE. Effect of the normal microbial flora on gastrointestinal motility. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; 126:301-4.

Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, *et al.* Surface phenotype and antigen specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007; 8:639-646.

AIOM. Associazione Italiana di Oncologia Medica. I numeri del cancro in Italia 2018.

AIOM. Associazione Italiana di Oncologia Medica. Linee guida Tumori del Colon 2017.

An D, Oh SF, Olszak T, *et al.* Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell* 2014; 156:123-33.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, *et al.* Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends in Immunol* 2012; 33:505-512.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, *et al.* The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008; 20:1361-8.

Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013; 500:232-6.

Atarashi K, Tanoue T, Shima T, *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 2011; 331:337-41.

Balachandran VP, Łuksza M, Zhao JN, *et al.* Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer. *Nature* 2017; 551:512-6.

Bandeira A, Mota-Santos T, Itohara S, *et al.* Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J Exp Med* 1990; 172:239-44.

Baptista AP, Olivier BJ, Goverse G, *et al.* Colonic patch and colonic SILT development are independent and differentially regulated events. *Mucosal Immunol* 2013; 6:511-21.

Bastide NM, Pierre FH, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: A meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4:177-84.

Bauer H, Horowitz RE, Levenson SM, *et al.* The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. *Am J Pathol* 1963; 42:471–483.

Beatty G, Paterson Y. IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumorinfiltrating CD4 T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma. *J Immunol* 2001; 166: 2276–2282.

Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 2014; 157:121–141.

Bergmann C, Strauss L, Wang Y, *et al.* T regulatory type 1 cells (Tr1) in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. *Clin Cancer Res* 2008; 14:3706–15.

Bhargava P, Mowey EM. Gut microbiome and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2014; 14:492.

Blank M, Barzilai O, Shoenfeld Y. Molecular mimicry and auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 32:111-8.

Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, *et al.* Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2008; 300:2765–78.

Boursi B, Mamtani R, Haynes K, *et al.* Recurrent antibiotic exposure may promote cancer formation—Another step in understanding the role of the human microbiota? *Eur J Cancer* 2015; 51:2655-64.

Bowman LM, Holt PG. Selective enhancement of systemic Th1 immunity in immunologically immature rats with an orally administered bacterial extract. *Infect Immun* 2001; 69:3719-27.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68:394-424.

Cahenzli J, Köller Y, Wyss M, *et al.* Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* 2013; 14:559-70.

Caio G, Volta U, Sapone A, *et al.* Celiac disease: a comprehensive current review. *BCM Medicine* 2017; 17:142.

Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: Colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23:1097-104.

Caretto D, Katzman SD, Villarino AV, *et al.* Cutting Edge: The Th1 Response Inhibits the Generation of Peripheral Regulatory T Cells. *J Immunol* 2010; 184:30-34.

Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, *et al.* Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006; 313:1126-30.

Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:1046S-51S.

Chang PV, Hao L, Offermanns S, *et al.* The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:2247-52.

Chen J, Wright K, Davis JM, *et al.* An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genoma Med* 2016; 8:43.

Cheng M, Qian L, Shen G, *et al.* Microbiota modulate tumoral immune surveillance in lung through a gdT17 immune cell-dependent mechanism. *Cancer Res* 2014; 74:4030-41.

Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, *et al.* Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17:5328–5337.

Corazza GR, Andreani ML, Biagi F, *et al.* The smaller size of the ‘coeliac iceberg’ in adults. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32:917–9.

Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, *et al.* Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity* 2005; 22:371–383.

Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* 2013; 339:286-91.

Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, *et al.* NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest* 2013; 123:700-11.

Crabbé PA, Nash DR, Bazin H, *et al.* Immunohistochemical observations on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice. *Lab Invest* 1970; 22:448-57.

Cresci GA, Bawden E. The Gut Microbiome: What we do and don’t know. *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition.* 2015; 30:734-746.

Cross AJ, Boca S, Freedman ND, *et al.* Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* 2014; 35:1516-22.

Dash R, Richards JE, Su ZZ, *et al.* Mechanism by Which Mcl-1 Regulates Cancer-Specific Apoptosis Triggered by mda-7/IL-24, an IL-10-Related Cytokine. *Cancer Res* 2010; 70:5034-5045.

Deshmukh HS, Liu Y, Menkiti OR, *et al.* The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nature Med* 2014; 20:524-30.

Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, *et al.* Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10- dependent TGF- $\beta$ -bearing regulatory cells. *J Immunol* 2005; 174:3237-46

Dieli-Crimi R, Cénit MC, Núñez C. The genetics of celiac disease: a comprehensive review of clinical implications. *J Autoimmun.* 2015; 64:26–41.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010; 107:11971-11975.

Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, *et al.* Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009; 10:857-63.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut* 2001; 48:526-35.

Emdad L, Lebedeva IV, Su ZZ, *et al.* Historical perspective and recent insights into our understanding of the molecular and biochemical basis of the antitumor properties of mda-7/IL-24. *Cancer Biol Ther* 2009; 8:391-400.

Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, *et al.* Th22 represent a distinct subset of human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119:3573–85.

Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, *et al.* Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Hum Gene* 2005; 77:112-9.

Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, *et al.* Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol* 2011; 22:1958-72.

Feng T, Wang L, Schoeb TR, *et al.* Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *J Exp Med* 2010; 207:1321-32.

Fonseca DM, Hand TW, Han SJ, *et al.* Microbiota-dependent sequelae of acute infection compromise tissue-specific immunity. *Cell* 2015; 163:354-66.

Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut* 2006; 55:285-291.

Friedman GD, Oestreicher N, Chan J, *et al.* Antibiotics and risk of breast cancer: up to 9 years of follow-up of 2.1 million women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2006; 15:2102-6.

Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013; 504:446-50

.  
Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana AIC 2015.

Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, *et al.* How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 2016; 352:539-44.

Gill N, Finlay BB. The gut microbiota: challenging immunology. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:636-7.

Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 2003; 24:652-8.

Golato M, Moretti M, Martinotti S, *et al.* Tumore del colon retto: percorsi diagnostici sulla base di linee guida internazionali. *Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio* 2016; 12:70-80.

Gomez de Agüero M, Ganal-Vonarburg SC, Fuhrer T, *et al.* The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* 2016; 351:1296-302.

Gordon HA, Bruckner-Kardoss E, Staley TE, *et al.* Characteristics of the germfree rat. *Acta anat* 1966; 64:367-89.

Gorham ED, Garland CF, Garland FC, *et al.* Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97:179-94.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, *et al.* *AJCC Cancer Staging Manual*. Springer 2004; 6° edizione.

Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, *et al.* Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity* 2015; 42:344-55.

Gustafsson BE, Midtvedt T, Strandberg K. Effects of microbial contamination on the cecum enlargement of germfree rats. *Scand J Gastroenterol* 1970; 5:309-14.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-74.

Harris RE. *Global epidemiology of cancer* 2015.

He W, Wang ML, Jiang HQ, *et al.* Bacterial colonization leads to the colonic secretion of RELM  $\beta$ /FIZZ2, a novel goblet cell-specific protein. *Gastroenterology* 2003; 125:1388-97.

Helgeland L, Dissen E, Dai KZ, *et al.* Microbial colonization induces oligoclonal expansions of intraepithelial CD8 T cells in the gut. *Eur J Immunol* 2004; 34:3389-400.

Hevia A, Milani C, Lopez P, *et al.* Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus. *MBio* 2014; 5:01548-14.

Hill DA, Siracusa MC, Abt MC, *et al.* Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. *Nature Med* 2012; 18:538-46.

Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, *et al.* Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 1998; 4:781-5.

Hu C, Wong FS, Wen L. Type 1 diabetes and gut microbiota: friends or foe? *Pharmacol Res* 2015; 98:9-15.

Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, *et al.* Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* 2013; 342:967-70.

Imaoka A, Matsumoto S, Setoyama H, *et al.* Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice. *Eur J Immunol* 1996; 26:945-8.

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, *et al.* Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; 278:5509-12.

Ismail AS, Behrendt CL, Hooper LV. Reciprocal interactions between commensal bacteria and gamma delta intraepithelial lymphocytes during mucosal injury. *J Immunol* 2009; 182:3047-54.

Ismail AS, Behrendt CL, Hooper LV. Reciprocal interactions between commensal bacteria and gamma delta intraepithelial lymphocytes during mucosal injury. *J Immunol* 2009; 182:3047-54.

Ivanov II, Atarashi K, Manel N, *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009; 139:485-98.

Ivarsson A, Persson LA, Juto P, *et al.* High prevalence of undiagnosed coeliac disease in adults: a Swedish population-based study. *J Intern Med* 1999; 245:63–8.

Jacquelot N, Enot DP, Flament C, *et al.* Chemokine receptor patterns in lymphocytes mirror metastatic spreading in melanoma. *J Clin Invest* 2016; 126:921-37.

Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, *et al.* Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* 2015; 21:8787-8803.

Jeffery IB, Lynch DB, O'Toole PW. Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *The ISME Journal* 2016; 10:170-182.

Jenner RG, Townsend MJ, Jackson I, *et al.* The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of Tcell differentiation through a shared set of target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:17876-17881.

Jiang R, Tan Z, Deng L, *et al.* Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* 2011; 54:900-9.

Kaisho T, Akira S. Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr Mol Med* 2003; 3:373–85.

Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, *et al.* Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 1996; 4:313-319.

Karimi K, Inman MD, Bienenstock J, *et al.* Lactobacillus reuteri-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:186-93.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:621–63.

Kawaguchi-Miyashita M, Shimizu K, Nanno M, *et al.* Development and cytolytic function of intestinal intraepithelial T lymphocytes in antigen-minimized mice. *Immunology* 1996; 89:268-73.

Khosravi A, Yáñez A, Price JG, *et al.* Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe* 2014; 15:374-81.

Koning F. Celiac disease: quantity matters. *Semin Immunopathol* 2012; 34:541-9.

Korn T, Bettelli E, Gao W, *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007; 448:484-7.

Kramer I, Lipp HP. Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics.* 2007; 32:1–14.

Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, *et al.* Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009; 114:1141–1149.

Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, *et al.* Bacteria-triggered CD4+ T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med* 2002; 196:505-15.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, *et al.* *Le basi patologiche delle malattie.* Elsevier Masson 2006; 7° edizione volume 2.

Lazarevic V, Glimcher LH. T-bet in disease. *Nat Immunol* 2011; 12:597-606.

Lee JW, Wang P, Kattah MG, *et al.* Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *J Immunol* 2008; 181:6536–6545.

Lerner A, Aminov R, Matthias T. Dysbiosis may trigger autoimmune diseases via inappropriate post-translational modification of host proteins. *Front Microbiol* 2016; 7:84.

- Li X, Atkinson MA. The role for gut permeability in the pathogenesis of type 1 diabetes – a solid or leaky concept? *Pediatr Diabetes* 2015; 16:485-92.
- Lopez P, de Paz B, Rodriguez-Carrio J, *et al.* Th17 responses and natural IgM antibodies are related to gut microbiota composition in systemic lupus erythematosus patients. *Sci Rep* 2016; 6:24072.
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012; 489:220-30.
- Lundin KE, Wijmenga C. Coeliac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 12:507.
- Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:478-85.
- Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, *et al.* Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. *Arthritis Rheumatol* 2016; 68:2646-61.
- Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ t. *Nat Immunol* 2008; 9:641–649.
- Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, *et al.* Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 2013; 339:1084-8.
- Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer” *International journal of molecular epidemiology and genetics*. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2016; 7:105-114.
- Martín R, Jiménez E, Heilig H, *et al.* Isolation of Bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by pcr-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time pcr. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 75:965–969.

Matsumoto S, Setoyama H, Umesaki Y. Differential induction of major histocompatibility complex molecules on mouse intestine by bacterial colonization. *Gastroenterology* 1992; 103:1777-82.

Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, *et al.* An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005 Jul 15; 122:107-116.

Mazzilli MC, Ferrante P, Mariani P, *et al.* A study of Italian pediatric celiac disease patients confirms that the primary HLA association is to the DQ ( $\alpha 1^* 0501$ ,  $\beta 1^* 0201$ ) heterodimer. *Human Immunol* 1992; 33:133–9.

McVay LD, Keilbaugh SA, Wong TM, *et al.* Absence of bacterially induced RELM $\beta$  reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. *J Clin Invest* 2006; 116:2914-23.

Meng RD, El-Deiry WS. p53-independent upregulation of KILLER/DR5 TRAIL receptor expression by glucocorticoids and interferon-gamma. *Exp Cell Res* 2011; 262:154-169.

Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, *et al.* Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* 1997; 3:1133-6.

Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma. *J Am Med Assoc Oncology* 2015; 1:653-61.

Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, *et al.* IL-22, but not IL-17, dominant environment in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res* 2011; 17:7529-538.

Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* 2011; 89:346-351.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683–765.

Morgan XC, Segata N, Huttenhower C. Biodiversity and Functional Genomics in the Human Microbiome. *Trends Genet* 2013; 29:51-58.

Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, *et al.* Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* 2014; 343:1249288.

Mosconi I, Geuking MB, Zaiss MM, *et al.* Intestinal bacteria induce TSLP to promote mutualistic T-cell responses. *Mucosal Immunol* 2013; 6:1157-67.

Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, *et al.* Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell* 2014; 158:1210.

Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, *et al.* The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med* 2010;42:587–95.

Narushima S, Sugiura Y, Oshima K, *et al.* Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. *Gut Microbes* 2014; 5:333-9.

Niccolai E, Cappello P, Taddei A, *et al.* Peripheral ENO1-specific T cells mirror the intratumoral immune response and their presence is a potential prognostic factor for pancreatic adenocarcinoma. *Int J Oncol* 2016; 49:393-401.

Niccolai E, Ricci F, Russo E, *et al.* The Different Functional Distribution of "Not Effector" T Cells (Treg/Tnull) in Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2017; 8:1900.

Nishikawa H, Kato T, Tawara I, *et al.* IFN-gamma controls the generation/activation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in antitumor immune response. *J Immunol* 2005; 175:4433-40.

Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 2010; 127:759-767.

Numasaki M, Fukushi J, Ono M, *et al.* Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003; 101:2620–2627.

Ochi A, Nguyen AH, Bedrosian AS, *et al.* MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells. *J Exp Med* 2012;209:1671-1687.

O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nat Immunol* 2009; 10:929–932.

Olszak T, An D, Zeissig S, *et al.* Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 2012, 336:489-93.

Out AA, Tops CM, Nielsen M, *et al.* Leiden Open Variation Database of the MUTYH gene. *Hum Mutat* 2010; 31:1205-15.

Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, *et al.* Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu Rev Immunol* 29: 71–109.

Pagliari D, Urgesi R, Frosali S, *et al.* The interaction among microbiota,immunity, and genetic and dietary factors is the condicio sine qua non celiac disease can develop. *J Immunol Res* 2015; 2015:123653.

Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, *et al.* Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5:177.

Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:265-276.

Paulos CM, Wrzesinski C, Kaiser A, *et al.* Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR4 signaling. *J Clin Invest* 2007; 117:2197-204.

Perez Martinez G, Bäuerl C, Collado MC. Understanding gut microbiota in elderly's health will enable intervention through probiotics. *Benef Microb* 2014; 5:235–46.

Perfetti V, Baldanti F, Lenti MV, *et al.* Detection of Active Epstein-Barr Virus Infection in Duodenal Mucosa of Patients With Refractory Celiac Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14:1216-20.

Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:141-53.

Petnicki-Ocwieja T, Hrnčir T, Liu YJ, *et al.* Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:15813-8.

Qiao S-W, Sollid LM, Blumberg RS. Antigen presentation in celiac disease. *Curr Opin Immunol* 2009; 21:111-7.

Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, *et al.* Tumor-reactive CD4<sup>+</sup> T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 2010; 207:637–650.

Quigley EM. Small intestinal bacterial overgrowth: what it is and what it is not. *Curr Opin Gastroenterol* 2014; 30:141–146.

Relazione annuale al Parlamento sulla celiachia 2017.

Reynders A, Yessaad N, Vu Manh TP, *et al.* Identity, regulation and in vivo function of gut NKp46<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> and NKp46<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>-</sup> lymphoid cells. *EMBO J* 2011; 30:2934-47.

Riddle MS, Murray JA, Cash BD, *et al.* Pathogen-specific risk of celiac disease following bacterial causes of foodborne illness: a retrospective cohort study. *Dig Dis Sci* 2013; 58:3242–45.

Riestra S, Fernandez E, Rodrigo L, *et al.* Prevalence of coeliac disease in the general population of northern Spain. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:398–402.

Ringel Y, Maharshak N, Ringel-Kulka T, *et al.* High throughput sequencing reveals distinct microbial populations within the mucosal and luminal niches in healthy individuals. *Gut Microbes* 2015; 6:173-181.

Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, *et al.* Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int* 2017; 2017:9351507.

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, *et al.* Interleukin-10 secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212:28–50.

Rosser EC, Mauri C. A clinical update on the significance of the gut microbiota in systemic autoimmunity. *J Autoimmun* 2016; 74:85-93.

Rossini A, Rumio C, Sfondrini L, *et al.* Influence of antibiotic treatment on breast carcinoma development in proto-neu transgenic mice. *Cancer Res* 2006; 66:6219-24.

Rotondi M, Lazzeri E, Romagnani P, *et al.* Role for interferon-gamma inducible chemokines in endocrine autoimmunity: an expanding field. *J Endocrinol Invest* 2003; 26:177-180.

Round JL, O'Connell RM, Mazmanian SK. Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota. *J Autoimmun* 2010; 34:220-5.

Rubinstein MR, Wang X, Liu W, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/b-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 2013; 14:195-206.

Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, *et al.* The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1538–44.

Russell MW, Ogra PL. Mucosal decisions: tolerance and responsiveness at mucosal surfaces. *Immunol Invest* 2010; 39:297-302.

Sanos SL, Bui VL, Mortha A, *et al.* ROR $\gamma$  and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 2009; 10:83-91.

Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* 2008; 60:131-44.

Sargent D, Sobrero A, Grothey A, *et al.* Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 2009; 27:872-877.

Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, *et al.* Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 2008; 29:958-70.

Sawa S, Cherrier M, Lochner M, *et al.* Lineage relationship analysis of ROR $\gamma$ <sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Science* 2010; 330:665-9.

Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, *et al.* ROR $\gamma$ <sup>+</sup> innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nature Immunol* 2011; 12:320-6.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331:1565-70.

Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J Infect Dis* 2011; 203:306-11.

Sefik E, Geva-Zatorsky N, Oh S, *et al.* Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR $\gamma$ <sup>+</sup> regulatory T cells. *Science* 2015; 349:993-7.

Seo N, Hayakawa S, Tokura Y. Mechanisms of immune privilege for tumor cells by regulatory cytokines produced by innate and acquired immune cells. *Semin Cancer Biol* 2002; 12:291-300.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, *et al.* IFN- $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2011; 410:1107-11.

Shen Y, Giardino Torchia ML, *et al.* Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe* 2012; 12:509-20.

Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; 30:636-645.

Singh P, Arora S, Singh A, *et al.* Prevalence of celiac disease in Asia: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2016; 3:1095–101.

Sivan A, Corrales L, Hubert N, *et al.* Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 2015; 350:1084-9.

Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med.* 2015; 21:698–708.

Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 2011; 12:383-90.

Stamnaes J, Sollid LM. Celiac disease: autoimmunity in response to food antigen. *Semin Immunol* 2015; 27:343–52.

Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, *et al.* Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:2333–40.

Sundin OH, *et al.* The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC Microbiology* 2017; 17:160.

Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, *et al.* Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:713-758.

Taga K, Mostowski H, Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 1993; 81:2964–2971.

Takahashi H, Numasaki M, Lotze MT, *et al.* Interleukin-17 enhances bFGF, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunol Lett* 2005; 98:189-193.

Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, *et al.* Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 2002; 195:161-169.

Tang C, Kamiya T, Liu Y, *et al.* Inhibition of Dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing Lactobacillus-mediated regulatory T cell expansion in the intestine. *Cell Host Microbe* 2015; 18:183-97.

Tang F, Chen Z, Ciszewski C, *et al.* Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15. *J Exp Med* 2009; 206:707–19.

Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, *et al.* Disease-associated Bias in T Helper Type 1 (Th1)/Th2 CD4+ T Cell Responses Against MAGE-6 in HLA-DRB1\*0401+ Patients With Renal Cell Carcinoma or Melanoma. *J Exp Med* 2002; 196:619–628.

Tezuka H, Abe Y, Iwata M, *et al.* Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* 2007; 448:929-33.

Thaiss CA, Zmora N, Levy M, *et al.* The microbiome and innate immunity. *Nature* 2016; 535:65-74.

Tjon JM, van Bergen J, Koning F. Celiac disease: how complicated can it get? *Immunogenetics* 2010; 62:641–51.

Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, *et al.* Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Med* 2014; 20:159-66.

Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol Med* 2010; 16:537-50.

Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, *et al.* Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* 1993; 79:32-7.

Van Puijtenbroek M, Nielsen M, Tops CM, *et al.* Identification of patients with (atypical) MUTYH-associated polyposis by KRAS2 c.34G > T prescreening followed by MUTYH hotspot analysis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Clin Cancer Res* 2008; 14:139–142.

Van Rossum LG, van Rijn AF, Laheij RJ, *et al.* Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population. *Gastroenterology* 2008; 135:82–90.

Vasen HFA, Tomlinson I, Castells A. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 12:88–97.

Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz H, *et al.* Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With *KRAS* Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2017; 317:2392–2401.

Vicari AP, Trinchieri G. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth? *Immunol Rev* 2004; 202:223–236.

Villmones HC, Haug ES, Ulvestad E, *et al.* Species Level Description of the Human Ileal Bacterial Microbiota. *Scientific Reports* 2018; 8:4736.

Volta U, Bellentani S, Bianchi FB, *et al.* High prevalence of celiac disease in Italian general population. *Dig Dis Sci* 2001; 46:1500–5.

Vong L, Lorentz RJ, Assa A, *et al.* Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 2014; 192:1870-7.

Wang L, Yi T, Kortylewski M, *et al.* IL-17 can promote tumour growth through an IL-6–Stat3 signalling pathway. *J Exp Med* 2009; 206:1457–1464.

Wen L, Ley RE, Volchkov PY, *et al.* Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes. *Nature* 2008; 455:1109-13.

Westall FC. Molecular mimicry revisited: gut bacteria and multiple sclerosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2099-104.

Wilke CM, Bishop K, Fox D, *et al.* Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends in Immunol* 2011; 32:603–611.

Willett WC. Diet and cancer: An evolving picture. *JAMA* 2005; 293:233-4.

Williams AM, Probert CS, Stepankova R, *et al.* Effects of microflora on the neonatal development of gut mucosal T cells and myeloid cells in the mouse. *Immunology* 2006; 119:470-8.

Wilson HL, Obradovic MR. Evidence for a common mucosal immune system in the pig. *Mol Immunol* 2015; 66:22-34.

Wingender G, Stepniak D, Krebs P, *et al.* Intestinal microbes affect phenotypes and functions of invariant natural killer T cells in mice. *Gastroenterology* 2012; 143:418-28.

Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes* 2012; 3:4-14.

Wu S, Rhee K, Albesiano E, *et al.* A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature Med* 2009; 15:1016-1022.

Xu X, Fu XY, Plate J, *et al.* IFN- $\gamma$  induces cell growth inhibition by Fas mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 1998; 58:2832-2837.

Yang H, Antony PA, Wildhaber BE, *et al.* Intestinal intraepithelial lymphocyte gamma delta-T cell-derived keratinocyte growth factor modulates epithelial growth in the mouse. *J Immunol* 2004; 172:4151-8.

Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20:16389–97.

Yasmin F, Tun HM, Konya TB, *et al.* Cesarean Section, Formula Feeding, and Infant Antibiotic Exposure: Separate and Combined Impacts on Gut Microbial Changes in Later Infancy. *Frontiers in pediatrics*. 2017; 5:2-13.

Yurkovetskiy L, Burrows M, Khan AA, *et al.* Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity* 2013; 39:400-12.

Zaidi MR, Merlino G. Two faces of IFN-g in cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17:6118-6124.

Zhang D, Chen G, Manwani D, *et al.* Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 2015; 525:528-32.

Zhang W, Chen Y, Wei H, *et al.* Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6432-9.

Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89:587-596.

Zitvogel, L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:715-27.

Zitvogel, L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:715-27.