

Ruolo del microbioma nel diabete mellito di tipo 1

Elisa Pala¹, Dario Iafusco², Anna Casu³, Roberta Pintus⁴
e Vassilios Fanos^{4,5} e Marco Songini⁶

¹Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università di Cagliari; ²Dipartimento della Donna, del Bambino e della Chirurgia Generale e Specialistica, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli; ³Translational Reserch Institute, AdventHealth, Florida, USA; ⁴Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università di Cagliari; ⁵Unità di terapia intensiva neonatale, Azienda Ospedaliera Universitaria e Università di Cagliari; ⁶Direttore del Centro per le Patologie Metaboliche, Ospedale San Michele, Cagliari

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2003b>

INTRODUZIONE

Il diabete mellito di tipo 1 (DMT1) è una malattia autoimmune, caratterizzata dalla distruzione delle cellule beta pancreatiche da parte delle cellule CD4+, CD8+, cellule T, con infiltrazione dei macrofagi nelle isole di Langerhans, comportando in questo modo perdita di cellule beta, deficienza insulinica non appena vengono perse l'80-90% delle cellule beta ed esordio clinico della malattia. L'eziopatogenesi è multifattoriale, sviluppandosi in soggetti geneticamente predisposti (HLA DR4-DQ8 e DR3-DQ2), sui quali agirebbero in maniera combinata, fattori immunologici e ambientali. Per quanto riguarda i fattori genetici, oltre 50 geni di suscettibilità sono stati individuati, ma non tutti contribuiscono alla suscettibilità nello stesso modo. I geni HLA-DR e -DQ rappresentano circa dal 40% al 50% del rischio genetico di malattia. Anche altri geni di suscettibilità, tra cui PTPN22, IL2Ra e CTLA4, sono strettamente correlati con DMT1 (1). Circa il 70% dei casi di DMT1 presenta alleli HLA predisponenti alla malattia, ma solo il 3-7% dei bambini con quegli alleli sviluppa DMT1 (2).

Qui di seguito è riportata una visione di insieme degli ultimi studi del DMT1 nel mondo, e del ruolo del microbiota intestinale nella patogenesi di tale malattia.

EPIDEMIOLOGIA

L'aspetto epidemiologico può fornire indizi importanti su fattori di rischio ambientale. I dati resi disponibili dall'International Diabetes Federation Atlas nella sua nona edizione (2019) sono relativi alla prevalenza e incidenza del DMT1 nei bambini di età inferiore a 15 anni di 94 nazioni, descrivono massima incidenza in Finlandia (60/100.000), Sardegna e Svezia, seguite da Kuwait, alcune altre nazioni nordeuropee, Arabia Saudita, Algeria, Australia, Nuova Zelanda, USA e Canada. Il minor nu-

FAD ECM "il Diabete"

Questa rassegna fa parte di un percorso di **formazione a distanza** accreditato a livello nazionale e disponibile gratuitamente nell'aula virtuale della SID (www.fad.siditalia.it).

Per partecipare al corso occorre:

1. Leggere la rassegna (disponibile anche on-line)
2. Registrarsi all'aula e iscriversi al corso "il Diabete"
3. Rispondere on-line al quiz di verifica e compilare il questionario di valutazione dell'evento FAD.

Una volta eseguito con successo il test di valutazione e compilato il questionario di valutazione dell'evento, sarà cura della Segreteria ECM della SID far pervenire l'attestato ECM del corso ai diretti interessati nei tempi e nelle modalità stabiliti dalla regolamentazione vigente.

Per ulteriori informazioni: www.fad.siditalia.it

mero di nuovi casi si osserva nell'Asia orientale e sudorientale (3). Dalla metanalisi di Mobasser et al. del 2020, l'incidenza mondiale è pari a 15 casi per 100.000 abitanti, la prevalenza è al 9,5/10.000, con valori più alti in Europa e America (4). L'incidenza del diabete di tipo 1 è aumentata negli ultimi decenni di una media annuale del 3-4% in tutto il mondo, con maggiore velocità nelle aree a minore incidenza del passato (3). Lo studio dell'epidemiologia e della prevenzione del diabete (EURODIAB), dal 1989, ha rilevato l'incidenza del DMT1 in tutta Europa, descrivendo un gradiente Nord-Sud, con il più alto tasso nei paesi scandinavi, ma con eccezione, al Sud, della Sardegna dove la malattia presenta un tasso simile a quello della Finlandia (5-6).

Tra l'etiopatogenesi genetica e quella ambientale, sicuramente uno dei dati più solidi a favore di quest'ultima è derivato da uno studio italiano condotto da ricercatori dell'Istituto Superiore di Sanità che ha valutato la ricorrenza di due patologie: il diabete mellito di tipo 1 e la celiachia, nelle coppie di gemelli italiani. Dal confronto tra la ricorrenza di malattia negli omozigoti rispetto ai dizigoti, risulta evidente che, mentre la celiachia deve essere considerata soprattutto una patologia geneticamente determinata (maggiore ricorrenza tra gli omozigoti rispetto ai dizigoti), il diabete sembra essere una malattia di origine ambientale (simile ricorrenza tra mono- e dizigoti). D'altra parte, la suscettibilità genetica non avrebbe potuto, da sola, spiegare la crescente incidenza di DMT1 in tutto il mondo, suggerendo il ruolo di una significativa componente non genetica nell'eziopatogenesi della malattia, e in particolare del microbiota umano (7).

IL MICROBIOTA NEL DIABETE MELLITO DI TIPO 1

Gli esseri umani sono colonizzati da numerosissime comunità microbiche saprofite e la grande maggioranza abita nel tratto gastrointestinale, che accoglie circa 100 trilioni di cellule batteriche (oltre che virus e funghi), 10 volte di più del numero di cellule del corpo umano (8). Dai vari studi risulta che il tratto gastrointestinale è dominato da 4 phyla batterici: Firmicutes, Bacteroides, Proteobacteria e Actinobacteria. I primi due sono i più abbondanti nell'intestino dell'adulto mentre, tra gli Actinobacteria, predominanti nei lattanti allattati al seno, il bifidobatterio, considerato probiotico, è il più abbondante (8-9). Tuttavia, composizione e diversità batterica

differiscono nelle diverse aree geografiche (10). Una qualità ottimale del microbiota intestinale garantisce protezione contro l'invasione di patogeni e fornisce all'ospite e ai commensali metaboliti nutrizionali, altrimenti non ottenibili (es. vitamine, butirrato, ecc). Anche la componente genetica orienta la struttura e funzione del microbiota gastrointestinale come dimostrato dallo studio di Buschart et al. (11). Il microbiota deve essere considerato una sorta di "organismo nell'organismo", attivo e dinamico nella sua composizione, influenzato da vari fattori esogeni ed endogeni (Tab. 1).

Approfondendo la composizione del microbiota nel diabete, in una coorte di studio messicana, i bambini all'inizio della malattia hanno un'abbondanza di Bacteroides, mentre i controlli sani hanno una prevalenza di Prevotella; tuttavia dopo due anni di terapia insulinica, i casi tendono ad assomigliare ai controlli (12). A questo proposito, molto interessante è stata la rassegna pubblicata su "il Diabete" lo scorso anno che ha messo in evidenza come il microbiota intestinale possa giocare un ruolo decisivo nei meccanismi di rischio cardiovascolare quali la aterosclerosi, l'ipertensione arteriosa, e "l'infiammazione" (13).

In una coorte di 33 neonati estoni e finlandesi, la diversità alfa (misura del numero di microbi distinti in una comunità), che di norma aumenta esponenzialmente nei primi tre anni di vita, cala del 25% nei bambini che svilupperanno DMT1 rispetto ai controlli, riducendosi dopo che hanno iniziato a formarsi gli autoanticorpi, ma prima della diagnosi di diabete (14). Il calo della diversità alfa nei casi dipenderebbe dalla sovrabbondanza di alcuni gruppi: Blautia, Rikenellaceae, Ruminococcus e Streptococcus. Al contrario, si nota una riduzione delle Lachnospiraceae e Veillonellaceae, similmente a quanto avviene nell'infiammazione (14). Tra i gruppi più rappresentati ci sono specie definite "patobionti", in grado di comportarsi come agenti patogeni (15). La quantità di Blautia sembra essere correlata ai livelli di IA-2 e all'aumento dell'HbA1c (16). Molto interessante è stata l'analisi condotta, raccogliendo ogni tre mesi campioni di feci da 4 coppie caso-controllo della coorte di studio Diabetes Prediction and Prevention (DIPP) in Finlandia (17). Di gran lunga, le due differenze più evidenti tra le comunità microbiche delle feci dei casi e dei controlli sono quelle tra i due phyla più abbondanti a tutti e tre i "time-points" di raccolta: i Bacteroidetes relativamente maggiori nei casi, e i Firmicutes relativamente maggiori nei controlli (18).

Tabella 1 ♦ Elementi che influenzano la stabilità e composizione del microbiota intestinale in relazione al diabete di tipo 1

	MODIFICHE DEL MICROBIOTA	MICROBIOTA E DMT1
Parto	Il microbiota di bambini nati da parto vaginale è simile al microbiota vaginale della madre, bambini nati con parto cesareo sono colonizzati con specie presenti sulla cute della madre e hanno minore abbondanza di alcune specie di <i>Bacteroides</i>	Bacteroides hanno un ruolo nello sviluppo e nella funzione del sistema immunitario stimolando la produzione da plasmociti di IgA secretorie. (29) B. Thetaiotaomicron Preservano la barriera intestinale. (29) B. Fragilis e B. Subtilis Promuovono la maturazione del tessuto linfoide associato all'intestino e la produzione di anticorpi. (29) B. Fragilis Inibiscono la citochina pro-infiammatoria IL-17 nell'intestino. (29)
Allattamento	Il microbiota materno viene trasferito nel latte. Le variazioni del microbiota del bambino sono correlate in modo dose-dipendente all'allattamento al seno. (73)	Bifidobacterium e Lactobacillus Presenti nel latte materno riducono gli oligosaccaridi in acidi grassi a catena corta, mantengono la barriera intestinale, stimolano la produzione di IgA. (29) (73) Bifidobacterium Infantis Predominante nei bambini nutriti con latte materno per i primi 6 mesi di vita, metabolizzano gli oligosaccaridi in acidi grassi a catena corta, promuovono la produzione e l'integrità del muco, svolgono un ruolo nella immuno-regolazione. (29) (73)
Antibiotici	Negli ultimi anni i ricercatori hanno ipotizzato che l'abuso di antibiotici sia correlato con l'aumento di incidenza di DMT1; tuttavia, i risultati degli studi finora disponibili sono poco chiari e contraddittori	Topi NOD trattati con antibiotici presentano alterazione del microbiota e riduzione delle cellule T-Reg nella lamina propria della mucosa. (8) Topi NOD di madri trattate con antibiotici risultano protetti dal DM. (8) L'impatto degli antibiotici sul microbioma nel DMT1 dipende dallo specifico antibiotico e deve essere ancora ben compreso. (8)
Dieta	La dieta ricca di grassi è correlata a variazioni del microbiota e ad aumento di infiammazione intestinale. (66) Diete ad alto contenuto di glutine, nonché la sua precoce introduzione nella dieta dei bambini favorisce la disbiosi associata a DMT1. (66)	Topi NOD con dieta priva di glutine hanno una riduzione di Bifidobacterium, Tannerella e Barnesiella e un aumento del numero di Akkermansia nell'intestino, con inversione dei rapporti dopo introduzione del glutine. (58) Topi con dieta ricca di grassi hanno una riduzione della specie Bifidobacterium e LPS intestinale più elevato, un aumento di citochine proinfiammatorie, intolleranza al glucosio e ridotta secrezione di insulina. (58)
Sostanze chimiche dannose per il sistema endocrino (EDCs)	L'esposizione agli EDCs può favorire o inibire la crescita di specifiche specie del microbiota intestinale, come dimostrato in modelli animali per l'arsenico e altri EDCs. (74)	I pochi studi disponibili suggeriscono che l'esposizione agli EDCs può alterare la composizione del microbiota intestinale e aumentare il rischio di DMT1, tuttavia con meccanismi ancora da chiarire. (74)

Inoltre, l'abbondanza di Clostridi diminuiva nelle feci dei casi e aumentava in quelle dei controlli, essendo responsabile della maggior parte delle discrepanze casi-controlli relative ai Firmicutes. Prima della comparsa degli autoanticorpi, si osservava già l'instabilità del microbiota e l'elevato rapporto tra Bacteroidetes e Firmicutes, rispetto ai controlli, entrambe queste caratteristiche possono essere marcatori diagnostici precoci, rilevabili prima della comparsa di autoanticorpi nel siero (18). Sebbene il numero di soggetti fosse limitato, tuttavia questa interessante osservazione può essere utile, in futuro, per organizzare studi epidemiologici e pianificare interventi di prevenzione attraverso lo studio della modifica del microbiota intestinale prima dell'esordio del diabete. Infatti, tale studio ha confermato che il microbiota nel diabete di tipo 1 ha delle caratteristiche peculiari ed appare essere meno stabile rispetto a quello di bambini sani.

Diversi lavori hanno riportato la riduzione di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nei bambini con diabete all'esordio della malattia, rispetto ai controlli sani, mentre *Bacteroides* *dorei* e *vulgatus* sono più rappresentati in bambini ad alto rischio di DM1 e con positività agli autoanticorpi (19-20). Ma la peculiarità del microbiota che si ritrova in pazienti che sviluppano il diabete di tipo 1, non si limita alle specie di batteri presenti, ma anche alle caratteristiche del genoma di tali microrganismi. Lo stesso studio, infatti, nota che il genoma di *B. dorei* dei controlli non presenta metilazione del DNA e manca di geni adenin-metiltransferasi, mentre il genoma di *B. dorei* dei casi contiene più di 20.000 siti metilati. Per questo motivo, potrebbe essere utile esaminare la metilazione del DNA nel microbioma intestinale, in quanto sembra influire sull'espressione genica e sulla funzione metabolica (21, 19). Dal confronto del microbiota di individui con DM1 e individui con diabete giovanile a patogenesi non autoimmune monogenica (MODY2) (22) si rilevano profonde differenze nella composizione microbica, dando valore al ruolo della disbiosi intestinale come causa, o concausa di malattia, piuttosto che come conseguenza dell'iperglicemia, a cui sarebbe logico pensare se la composizione fosse simile in queste due patologie (22).

Virus e viroma intestinale nel DM1

Oltre alla flora batterica, nell'intestino umano troviamo anche funghi e virus. Queste componenti minori sono meno conosciute, soprattutto nell'ambito della patogenesi

si delle malattie umane. Lo studio dei virus e del viroma umano si avvale oggi di tecniche moderne, quale la Next Generation Sequencing (NGS) che consente l'analisi dell'intero viroma nei bambini con aumentato rischio genetico per DM1 (23). Tutte le informazioni che si stanno raccogliendo sul ruolo dei virus nella patogenesi del diabete, però, andrebbero meglio inquadrare nel vasto teatro di interazione con il microbiota intestinale (Tab. 2).

In uno studio longitudinale, su una coorte di bambini a rischio di diabete, l'analisi dei viromi intestinali tra bambini che sviluppano autoimmunità e quelli che non la sviluppano, ha mostrato, nel tempo, minore biodiversità e ricchezza di alcuni virus nei casi, tra cui minore prevalenza di Circoviridae. Quest'ultimo si ipotizza che, essendo più abbondante nei controlli, abbia un effetto protettivo sull'ospite. Alcuni dei batteriofagi (virus che infettano batteri) del viroma correlati alla malattia sembrano associati ai profagi dei *Bacteroides*. Si è quindi ipotizzato che i cambiamenti nei batteriofagi, prima della sier conversione, potrebbero contribuire ai cambiamenti osservati nel viroma. A sua volta i cambiamenti del microbiota batterico che compaiono più tardi, nel corso dello sviluppo della malattia autoimmune, potrebbero essere secondari alle più precoci variazioni nei batteriofagi (24). Kimp et al. avanzano la proposta che i batteriofagi infettanti le specie di *Bacteroides* potrebbero, almeno teoricamente, essere usati per ridurre l'abbondanza di *Bacteroides* osservata in individui con autoimmunità (19). Inoltre, non trascuriamo i risultati di un recente studio che descrive l'effetto, questa volta protettivo, dell'infezione da Norovirus (Caliciviridae) nei topi NOD, nel ridurre l'incidenza del DM1, inducendo modifiche del microbiota e una risposta immunitaria protettiva. L'eventuale azione protettiva di infezioni enteriche nell'uomo, e in particolare del Norovirus, è ancora da valutare (25).

METABOLOMICA

La metabolomica, una nuova scienza descritta per la prima volta da Guah-Ferrè et al., comprende l'analisi sistematica dei metaboliti di un campione biologico (26). È recente l'osservazione che la perturbazione del metabolismo, come conseguenza della disbiosi intestinale, sembra compromettere la funzione immunitaria (27). Infatti, da uno studio sulle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) isolate dalla coorte di neonati dello stu-

Tabella 2 ◆ **Ruolo dei virus nel diabete di tipo 1**

VIRUS E DIABETE DI TIPO 1	REF.
Vari studi hanno rilevato anticorpi contro Cocksackievirus B4 nei pazienti con diabete	(23)
Questi virus sembrano potenzialmente in grado di causare infiammazione delle isole pancreatiche e morte delle cellule beta	
In una meta-analisi di 26 studi, si riscontra un'associazione significativa tra infezione da Enterovirus, autoimmunità e diabete mellito di tipo 1	(71)
Gli studi, fino ad ora, non hanno determinato se le associazioni tra infezioni precoci e diabete di tipo 1 siano il risultato di una suscettibilità alle infezioni virali causata da una risposta immunitaria disregolata, ma è bene sottolineare che i geni deputati alla risposta antivirale sono collegati alla suscettibilità al diabete di tipo 1	
La persistenza prolungata del sierotipo di Enterovirus B (EV-B) nei bambini sembra fortemente associato allo sviluppo di autoimmunità	(73)
L'infezione da Metadenovirus C (HAdV-C) in infanzia sembra essere associata a ridotto rischio di autoimmunità e DT1	
I virus potrebbero causare la morte delle cellule beta attraverso una disregolazione, virus-indotta, dell'eccezionale carico biosintetico delle cellule beta, causando stress del reticolo endoplasmatico e generazione di neoantigeni	(72)

dio DIPP (Diabetes Prediction and Prevention), i livelli di aminoacidi a catena ramificata rilevati, sono più elevati nei pazienti con diabete rispetto ai controlli; del resto, questi aminoacidi favoriscono l'alterazione della lipogenesi e l'attività proinfiammatoria delle PBMC (27). Lo studio dell'espressione genica nel microbiota intestinale di Kostic et al., prima dell'esordio clinico di diabete, ha dimostrato uno "shift" dalla sintesi al trasporto passivo di nutrienti, caratteristico degli organismi auxotrofici che prosperano in ambienti infiammatori (14). In linea con questo ambiente, Wekamp et al. hanno trovato livelli più alti di β -difensina 2 nei campioni di bambini con DMT1, un prodotto antimicrobico delle cellule epiteliali del colon, liberato durante l'infiammazione (28). I metaboliti modulati e/o prodotti dal microbiota intestinale, in particolare gli acidi grassi a catena corta (SCFAs) hanno un ruolo significativo nell'omeostasi generale e riducono l'infiammazione intestinale (29). È stato osservato un aumento significativo degli SCFAs nei neonati allattati al seno, correlabili ai maggiori livelli Bifidobacterium sp. presenti nel latte materno. Tra gli SCFAs, il butirrato, migliora l'omeostasi del glucosio, è un substrato energetico per l'epitelio del colon, ostacola l'infiammazione intestinale e la carcinogenesi, modula la risposta immunitaria inducendo la differenziazione delle cellule T regolatorie (Tregs), e inibendo le citochine infiammatorie, come

IFN- γ (29-30). Sulla base delle esperienze precedenti, sono stati eseguiti anche esperimenti di supplementazione orale di SCFAs nei topi NOD (Non Obesi Diabetici) nei quali si è dimostrata la riduzione dell'incidenza di DMT1 (30). Risultati simili sono stati ottenuti con una dieta ricca di acetato e butirrato, mostrando una modulazione della popolazione di cellule T autoreattive (31).

Un'ulteriore prova di tale osservazione, deriva dalle osservazioni fatte negli studi longitudinali TRIGR e FINDIA, nei quali le specie produttrici di SCFAs tra cui Bifidobacterium adolescentis, Roseburia faecis e Faecalibacterium prausnitzii sono risultate correlate negativamente con il titolo anticorpale (30). Infine nello studio The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) si è osservata maggiore espressione di geni microbici associati alla fermentazione e alla biosintesi di SCFAs nei controlli rispetto ai diabetici (32).

Se consideriamo altri metaboliti, dagli studi di Arneth et al., gli aminoacidi aromatici e quelli a catena ramificata sono più elevati nel profilo metabolico del DMT1. Il principale produttore di questi aminoacidi è il microbiota intestinale, in particolare le Escherichia coli che metabolizzano l'acido piruvico, la produzione del quale è aumentata al crescere dei livelli di glucosio disponibile. Quindi, più alti sono i livelli di glucosio nel sangue maggiore è la produzione di aminoacidi a catena ramificata (33).

Tabella 3 ◆ **Metaboliti e alterazioni del metabolismo correlati al microbiota intestinale in corso di diabete**

INTERFERENZE DEL MICROBIOTA CON IL METABOLISMO IN CORSO DI DIABETE	
Bifidobacterium e Lactobacillus ridotti determinano ridotti livelli di SCFAs, con conseguente aumento della permeabilità intestinale e traslocazione batterica	(30)
Escherichia Coli metabolizzano Ac Piruvico dal glucosio in caso di iperglicemia con aumentata produzione di aminoacidi aromatici a catena ramificata	(33)
Bautia aumentano i trigliceridi a catena lunga e aminoacidi a catena ramificata Ruminococcus aumentano i trigliceridi a catena corta e aminoacidi a catena ramificata	(14)
L'aumento di Ruminococcus e la riduzione di Veillonella sono associati a aumento di sfingomielina e riduzione di acido litocolico	(14)

Per quanto riguarda i lipidi, Vergès et al. hanno evidenziato una correlazione tra *Blautia* e trigliceridi (TG) a catena lunga e *Ruminococcus* e TG a catena corta (34). Mentre un gruppo di studio ha identificato cambiamenti negli acidi biliari, solfato di p-cresolo e acido furoico nei bambini con diabete. Tali cambiamenti sono riconducibili ad uno squilibrio del microbiota, di cui potrebbero essere considerati markers di alterazione (35). Lo studio di Galderisi et al. dimostra che, anche se i livelli di HbA1c si mantengono entro il target raccomandato, il rischio di mortalità per malattie cardiovascolari rimane almeno due volte superiore rispetto alla popolazione generale. Nello squilibrio metabolico di questa malattia, alcune vie coinvolte rimangono alterate nonostante il buon controllo glicemico e sarebbe utile individuarle dall'esordio (36-37). È interessante notare che il livello degli aminoacidi a catena ramificata e degli SCFAs, correlato al microbioma, è anche associato all'obesità e al diabete di tipo 2, e il microbioma potrebbe essere un importante mediatore dei meccanismi immunitari nel diabete autoimmune latente dell'adulto (38-40).

Alla luce di queste acquisizioni, per comprendere la complessa patogenesi del DMT1, conoscere il microbiota e la dinamicità dei suoi cambiamenti relati alle patologie umane non può prescindere dallo studio, in continuo ampliamento, delle vie metaboliche e dei metaboliti ad esso associati (Tab. 3) (8).

RUOLO DEL MICROBIOTA NELLA PATOGENESI DEL DMT1

Il meccanismo che porta allo sviluppo della patologia autoimmune è complesso e multifattoriale, e in questo percorso il ruolo del microbiota intestinale sembra determinante. Dei cambiamenti tassonomici del microbioma intestinale nel DMT1 riportati nei paragrafi precedenti, sono stati valutati i possibili effetti correlabili al DMT1 (Tab. 4 e Tab. 5) (8). Per comprendere la complessità della patogenesi è necessario capire il collegamento tra disbiosi intestinale, alterata permeabilità della barriera intestinale, e risposta immunitaria. Questa interazione sembra avere un ruolo cruciale nell'insorgenza di diverse malattie autoimmuni, tra cui il DMT1 (18).

Microbiota e intestino

La parete intestinale evita il contatto tra contenuto luminale (microbiota incluso) e il resto dell'organismo, se sono preservate l'integrità dell'epitelio (delle giunzioni aderenti tra le cellule) e del muco. L'avvio del processo autoimmune nei modelli preclinici di malattia è associato ad alterazioni della struttura del muco e alla perdita di integrità della barriera intestinale documentati in studi sull'uomo oltre che su modelli animali (41). Si è visto che l'interruzione della barriera intestinale indotta dall'infezione da *C. rodentium* accelera l'insulite nei topi NOD, ma se vengono infettati da un ceppo incapace di alterare l'integrità intestinale, l'infiammazione non viene influenzata (42). Vari studi hanno rilevato livelli maggio-

Tabella 4 ◆ Cambiamenti del microbiota all'esordio del diabete mellito autoimmune rispetto a controlli sani

STUDI DI PREVALENZA DI UNA FLORA BATTERICA INTESTINALE ALL'ESORDIO DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 1			
DMT1 ALL'ESORDIO	CONTROLLI		REFERENZA
Bacteroides Il polisaccaride A di Bacteroides Fragilis induce la produzione di IL-10 e sopprime le risposte delle cellule Th17	Prevotella		(12) (32)
Riduzione dei Lactobacillus e Bifidobacterium	Aumento dei Lactobacillus e Bifidobacterium I Bifidobacterium producono acidi grassi a catena corta nei neonati allattati al seno. Tra tali acidi, il butirato migliora l'omeostasi del glucosio e modula la risposta immunitaria inducendo la differenziazione delle cellule T Regolatorie (T-Regs) e inibendo le citochine infiammatorie, come interferone- γ		(19) (32) (33)
Aumento di Blautia correlato con livelli di IA2 e HbA1c			(16)
	Maggiore espressione di geni microbici associati alla fermentazione e alla biosintesi acidi grassi a catena corta nei controlli rispetto ai pazienti con diabete	Studio TEDDY	(34)
Dialister Invisus, Gemella Sanguinis e Bifidobacterium Longum aumentano la permeabilità intestinale primum movens per la comparsa di diabete			(52)

ri di zonulina nei pazienti con DMT1, da correlare con una maggiore permeabilità intestinale, in particolare nei pazienti con diabete di tipo 1 (43-46). Watts e colleghi usano un antagonista della zonulina nel loro studio, ottenendo un miglioramento dell'integrità intestinale nei ratti BB-DP accompagnato dalla riduzione del rischio di DMT1 (47). È stato dimostrato che la mucosa duodenale nel DMT1 presenta anomalie specifiche del microbiota e del profilo immuno-infiammatorio (48). Gli studi riportati nella metanalisi di Zheng et al. hanno dimostrato che quando la barriera intestinale è compromessa, le cellule T linfonodali drenanti il pancreas, in particolare le cellule T CD8 +, si attivano e proliferano, promuovendo l'insulite. I pazienti con DMT1 hanno un'aumentata infiammazione intestinale e i taxa microbici capaci di preservare la barriera mucosa, l'adesione cellulare e i

microvilli, garantire la funzione del pancreas esocrino, sono ridotti prima dell'inizio del diabete (49). Maffei e colleghi, in uno studio caso-controllo identificano 3 batteri, *Dialister invisus*, *Gemella sanguinis* e *Bifidobacterium longum*, fortemente associati ad alterata permeabilità intestinale nel DMT1 (50). È stato provato che la perdita dell'integrità della barriera intestinale nei topi BDC2.5XNOD può portare all'attivazione di gruppi di cellule T autoreattive all'interno della mucosa (18, 51). In quei topi, la colonizzazione intestinale con *Akkermansia muciniphila* contrasta il diabete autoimmune aumentando la secrezione di peptidi antibatterici e la produzione del muco. Quest'ultimo influenza il tipo di batteri commensali che risiedono nel suo strato interno, selezionando il passaggio di prodotti batterici attraverso la parete intestinale nella circolazione sistemica, e la sua in-

Tabella 5 ♦ Cambiamenti del microbiota intestinale nel pre-diabete mellito di tipo 1 autoimmune

STUDI DI PREVALENZA DI UNA FLORA BATTERICA INTESTINALE NEL PRE-DIABETE MELLITO DI TIPO 1			
PRE DMT1	CONTROLLI		REFERENZA
Aumento di Blautia Rikenellaceae Ruminococcus e Streptococcus			(14)
Riduzione di Lachnospiraceae e Veillonellaceae			
Aumento di Phyla Bacteroidetes	Aumento di Firmicudes Clostridium	Studio DIPP Finlandia	(17) (32)
Riduzione di Clostridi	Alcuni tipi di Clostridium stimolano le cellule T-Reg anti-infiammatorie		
Aumentato rapporto Bacteroidetes/Firmicudes	Aumentato rapporto Firmicudes/Bacteroidetes		(18)
Correlazione con la comparsa di autoanticorpi del diabete			
Presenza di Bacterioides Dorei e Vulgatus in bambini ad alto rischio per diabete con positività degli dei markers autoimmuni			(20)
	Firmicutes, Lactobacilli e Bifidobacteria , ridotti nei pazienti con diabete mellito di tipo 1, sono protettivi in quanto stimolano il ramo regolatorio del sistema immunitario, aumentando le cellule T-Reg		(59)
Da uno studio del 2016 risulta che l'endotossina dei Bacteroides ha proprietà immuno-inibitorie, e potrebbe precludere l'adeguato sviluppo del sistema immunitario			(61)
Bacterioides e Proteobacteria phyla sono i principali stimolatori delle cellule MAIT della mucosa intestinale soprattutto nei primi anni di vita inducendo predisposizione alle patologie autoimmunitarie			(64)
	L'LPS di E. Coli è immunostimolante e induce tolleranza immunitaria alle successive esposizioni a microbi stimolatori, proteggendo dall'autoimmunità		(21)
Bacteroides Dorei con elevata metilazione del DNA (più di 10.000 siti metilati)	Bacterioides Dorei con DNA non metilato e mancanza di geni adenin-metiltransferasi		(19) (21)
	Bifidobacterium Adolescentis, Roseburia Faecis e Faecalibacterium Prausnitzii correlate negativamente con il titolo anticorpale	Studi TRIGR e FINDIA	(33)

tegrità è fondamentale per consentire l'hosting di batteri commensali benefici come i bifidobacterium produttori di SCFAs (risultati ridotti nei bambini con autoimmunità e DMT1 in vari studi) che promuovono la tolleranza immunitaria nell'intestino e regolano la permeabilità della mucosa, impedendo la traslocazione di batteri (30, 52). Al contrario, la prevalenza di alcuni gruppi di Bacteroides, associata a svezzamento precoce, determina riduzione della produzione di butirrato, alterazione nella composizione in batteri che degradano la mucina, aumentando il rischio di autoimmunità (52). Inoltre, il muco contiene mucine e peptidi antimicrobici (PAM), rilasciati dalle cellule intestinali, come α -difensine e catelicidine, la cui espressione risulta alterata in pazienti con DMT1. Infatti, le catelicidine sono ridotte nel siero dei pazienti con diabete, e nei topi NOD si ha un'espressione ridotta del peptide antimicrobico pancreatico correlato alla catelicidina (PAMRC) (51). Molto interessante è sicuramente la evidenza che la produzione di catelicidina viene indotta dalla vitamina D. Essendo i pazienti con diabete di tipo 1, soprattutto all'esordio, spessissimo carenti di vitamina D, è suggestivo chiedersi se la carenza di catelicidina sia dovuta, in primis, alla carenza di tale vitamina oppure sia legata al dismicrobismo. Poiché, infine, i livelli di tale proteina a loro volta influenzano la crescita batterica intestinale, è difficile ipotizzare quale possa essere il "primum movens" di tale meccanismo patogenetico (53). Anche lo stress ossidativo può alterare la mucosa intestinale e contribuire allo sviluppo della malattia. Valadares et al. hanno scoperto che la somministrazione di *L. johnsonii* N6.2 mantiene la funzione della barriera intestinale influenzando i geni della giunzione stretta, modifica la composizione microbica intestinale, riduce i livelli di marcatori di stress ossidativo e aumenta l'espressione di Cox-2, ritardando l'insorgenza di DMT1 nei ratti BB-DP (predisposti al diabete) (54). Quindi è possibile, almeno nei modelli animali, modulare la flora batterica per prevenire il DMT1 (Tab. 6).

Microbiota e sistema immunitario

Il microbiota ha un ruolo cruciale nella maturazione ed istruzione del sistema immunitario nell'organismo umano. Si è osservato che i batteri filamentosi segmentati (SFB) proteggono i topi NOD femmina e non i maschi dallo sviluppo del diabete inducendo una risposta immunitaria protettiva, come se il microbiota possa influenzare la

penetranza delle malattie autoimmuni in soggetti predisposti (55). Dedrick et al. identificano batteri protettivi, come i lattobacilli, i bifidobatteri e alcune specie di *Clostridium*, che stimolano le cellule Treg anti-infiammatorie; lo stesso gruppo evidenzia che il polisaccaride A di *Bacteroides fragilis* induce la produzione di IL-10 e sopprime le risposte delle cellule Th17 (29). Studi sia su animali che su esseri umani mostrano una connessione, mediata dal microbiota, tra cellule Th17 e l'alterazione Treg/Teff tipica del diabete. Nei topi NOD, in cui si sono rilevati alti livelli di IL-17 nelle isole pancreatiche, l'inibizione delle cellule Th17 ha ridotto l'incidenza del diabete. Gli studi hanno evidenziato che il microbiota regola il rapporto Th17/Treg e può influenzare la risposta immunitaria intestinale e sistemica coinvolta nel diabete (56). Al contrario, Firmicutes, Lactobacilli e Bifidobacteria, ridotti nei pazienti con DMT1, sono protettivi in quanto stimolano il ramo regolatorio del sistema immunitario, aumentando le cellule Treg (57). Per quanto riguarda l'endotossina, o lipopolisaccaride (LPS), è un componente della membrana dei batteri Gram-negativi, ed è stato riscontrato elevato nei casi di uno studio caso-controllo ed in grado di aumentare il livello di citochine pro-infiammatorie e compromettere la funzione delle cellule beta del pancreas (58). Da uno studio del 2016 risulta che l'endotossina di *Bacteroides* ha proprietà immunoinibitorie, e potrebbe precludere l'adeguato sviluppo del sistema immunitario (59). L'LPS di *E. coli*, al contrario, è immunostimolante e induce tolleranza immunitaria alle successive esposizioni a microbi stimolatori, proteggendo dall'autoimmunità (21). Poiché i linfociti isolati dai linfonodi mesenterici (MLN) di topi NOD prediabetici sono in grado di indurre la malattia se trasferiti in topi riceventi, l'intestino potrebbe essere il sito di attivazione e espansione delle cellule T autoreattive (51). Esiste, dunque, un asse immunologico tra intestino e pancreas, sostenuto dalla loro comune origine endodermica, nel quale le cellule T viaggiano dalla mucosa intestinale ai tessuti pancreatici attraverso la circolazione sistemica. La maggior parte delle cellule T autoreattive presenti nei linfonodi pancreatici e i linfociti intraislet (IIL) dei topi BDC2.5, esprimono il marker di homing intestinale $\alpha 4\beta 7$, a prova della loro origine enterica (51). Per valutare il contributo di TLR4 allo sviluppo di DMT1, Elke et al. hanno generato un ceppo di topi NOD che manca dell'espressione di TLR4, nel quale è aumentata l'infiltrazione di cellule immunitarie nelle isole

Tabella 6 ♦ La modulazione del microbiota in studi su animali nella prevenzione del diabete mellito autoimmune

STUDI DI MODULAZIONE DELLA FLORA BATTERICA IN ANIMALI PER PREVENIRE IL DIABETE MELLITO AUTOIMMUNE	
La colonizzazione intestinale con Akkermansia Muciniphila contrasta il diabete autoimmune in modelli murini aumentando la secrezione di peptidi antibatterici e la produzione del muco. Quest'ultimo influenza il tipo di batteri commensali che risiedono nel suo strato interno, selezionando il passaggio di prodotti batterici attraverso la parete intestinale nella circolazione sistemica, e la sua integrità è fondamentale per consentire l'hosting di batteri commensali benefici come i <i>Bifidobacterium</i> produttori di acidi grassi a catena corta (risultati ridotti nei bambini con autoimmunità e DMT1 in vari studi) che promuovono la tolleranza immunitaria nell'intestino regolando la permeabilità della mucosa e impedendo la traslocazione di batteri	(55)
La somministrazione di L. Johnsonii N6.2 mantiene la funzione della barriera intestinale influenzando i geni che modulano la formazione delle tight junctions intestinali, modificando la composizione microbica intestinale, riducendo i livelli di marcatori di stress ossidativo, aumentando l'espressione di Cox-2, e ritardando l'insorgenza di diabete mellito autoimmune nei ratti BB-DP (predisposti al diabete)	(56)
Si è osservato che i Batteri Filamentosi Segmentati (SFB) proteggono i topi NOD femmina e non i maschi dallo sviluppo del diabete inducendo una risposta immunitaria protettiva	(57)

pancreatiche, accelerando la malattia (51). Un'adeguata microflora intestinale, quindi, induce un aumento di cellule T regolatorie di tipo 1 (Tr1) nell'intestino, che possono migrare verso la periferia, inibendo l'attivazione delle cellule T effettrici e diminuendo l'incidenza del diabete (8). È stato scoperto che la condizione "specific pathogen free" (SPF) previene la disbiosi e il DMT1 nei topi knockout per il gene della risposta primaria di differenziazione mieloide (*myd88*), importante nel sistema immunitario innato. Tuttavia, la crescita in ambiente "germ free" (GF) ha eliminato l'effetto protettivo, suggerendo la funzione determinante del microbioma intestinale nel mediare questo effetto (21, 60). È stato scoperto che i segnali TLR4 e TLR2 microbiota-dipendenti determinano rispettivamente protezione e maggiore suscettibilità al diabete, non è ancora chiaro se l'effetto sia diretto o dovuto a una modulazione del microbiota (21). Mullaney et al. hanno individuato degli alleli (*Idd3/5*) protettivi nei topi NOD, associati a maggiore produzione di IL-2 (61). L'alterazione della via della IL-2 influenza l'infiammazione intestinale, e la terapia con IL-2 aumenta le cellule Treg che modulano il microbiota, e porta a maggiore produzione di muco dalle cellule caliciformi. Quindi l'immunoterapia con IL-2, mediante il potenziamento delle cellule Treg nei pazienti con DMT1, potrebbe influire positivamente sul microbiota e sulla malattia (61).

Microbiota e MAITs

Han et al. hanno valutato il ruolo delle cellule-T associate alla mucosa (MAIT): linfociti innati con un effetto

protettivo nelle infezioni batteriche, sebbene il loro ruolo debba ancora essere chiarito (58). È stata ipotizzata un'interazione tra MAIT, microbiota e conseguente sviluppo del DMT1. Studiando topi germ free "contaminati" in seguito con diverse specie batteriche, hanno dedotto che è necessario l'intervento della flora commensale per l'espansione delle cellule MAIT alla periferia, le quali sarebbero coinvolte nell'interazione con il microbiota nelle malattie infiammatorie croniche (62). Fino ad oggi, è noto che solo specie batteriche selezionate, per lo più patogene, stimolano le cellule MAIT. Tastan et al. hanno sviluppato un test in vitro con cellule T umane CD8 + ingegnerizzate che esprimono il recettore MAIT-TCR per identificare i metaboliti batterici che stimolano queste cellule (62). Risulta che le specie dei *Bacteroidetes* e dei *Proteobacteria* phyla sono i principali stimolatori, mentre non hanno, in nessun modo, capacità di stimolazione le specie che mancano della via della riboflavina, rivelandosi il principale strumento batterico di interazione con questi linfociti (62). Magalhaes et al. mostrano che i batteri commensali hanno un impatto sull'omeostasi delle cellule T natural killer (iNKT) intestinali e sulle cellule MAIT (63). La disbiosi e l'integrità intestinale alterata potrebbero portare alla presenza di ligandi dei TLR nel sangue e nei tessuti periferici, inducendo l'attivazione delle cellule iNKT e MAIT. Tuttavia sembra che specifici ligandi, derivati da alcuni microbi intestinali, potrebbero alternarne la funzione, aumentando la produzione di IL-17 e l'attività infiammatoria (63). Costantinides et al. hanno dimostrato che la colonizzazione microbica

nei primi anni di vita è fondamentale nello sviluppo del sistema immunitario (64). Affermano, infatti, che per lo sviluppo stabile nei tessuti delle cellule MAIT, esiste una finestra temporale, ristretta alla prima infanzia, in cui deve avvenire l'esposizione a specifiche comunità microbiche, mentre l'esposizione più avanti non può compensare la mancata colonizzazione neonatale. In questo modo, il sistema immunitario interagisce con il microbiota, attraverso il riconoscimento di antigeni microbici da parte di cellule T, tra cui le cellule MAIT, in un dialogo che può svolgere un ruolo determinante nella fisiologia e patologia dell'ospite (64).

Microbiota e IgA

In un recente studio, l'alterato profilo del microbiota intestinale del diabete autoimmune insieme ad una minore produzione di SCFAs, sono messi in relazione all'alterata immunità mediata da IgA, rispetto ai controlli sani (65). Le IgA sono una componente importante nell'omeostasi della barriera intestinale e del muco. La colonizzazione di topi NOD GF con microbiota di pazienti diabetici, ha mostrato una diversa composizione rispetto a quella ottenuta mediante colonizzazione dai controlli, e ha favorito la permeabilità intestinale. Lo stesso studio riporta livelli di SCFAs nelle feci dei diabetici significativamente minori rispetto ai controlli, associati a aumentati livelli di IgA leganti batteri intestinali, suggerendo che gli SCFAs derivanti dal microbiota modulano l'attività delle IgA di legare specifici batteri commensali nel DMT1. Nello studio hanno rilevato che il trattamento con acetato (tra gli SCFA) sia dei topi NOD GF che SPF, inibisce la produzione di B cellule secernenti IgA nel midollo osseo, oltre che nei MLN. Pare che l'acetato moduli la risposta immunitaria IgA mediata verso i commensali, riducendo l'espressione del recettore polimerico per Ig (Pigr), che induce soppressione dell'immunità IgA mediata, e migliora l'insulite nei topi NOD, riducendo l'infiltrazione di cellule T CD4+ nelle isole pancreatiche e aumentando le cellule Treg nelle placche di Peyer. Il contributo di questa risposta immunitaria nell'uomo, associata con il microbiota intestinale, nel determinare lo sviluppo di DMT1, dovrebbe essere valutato in ulteriori studi (65).

Modello patogenetico

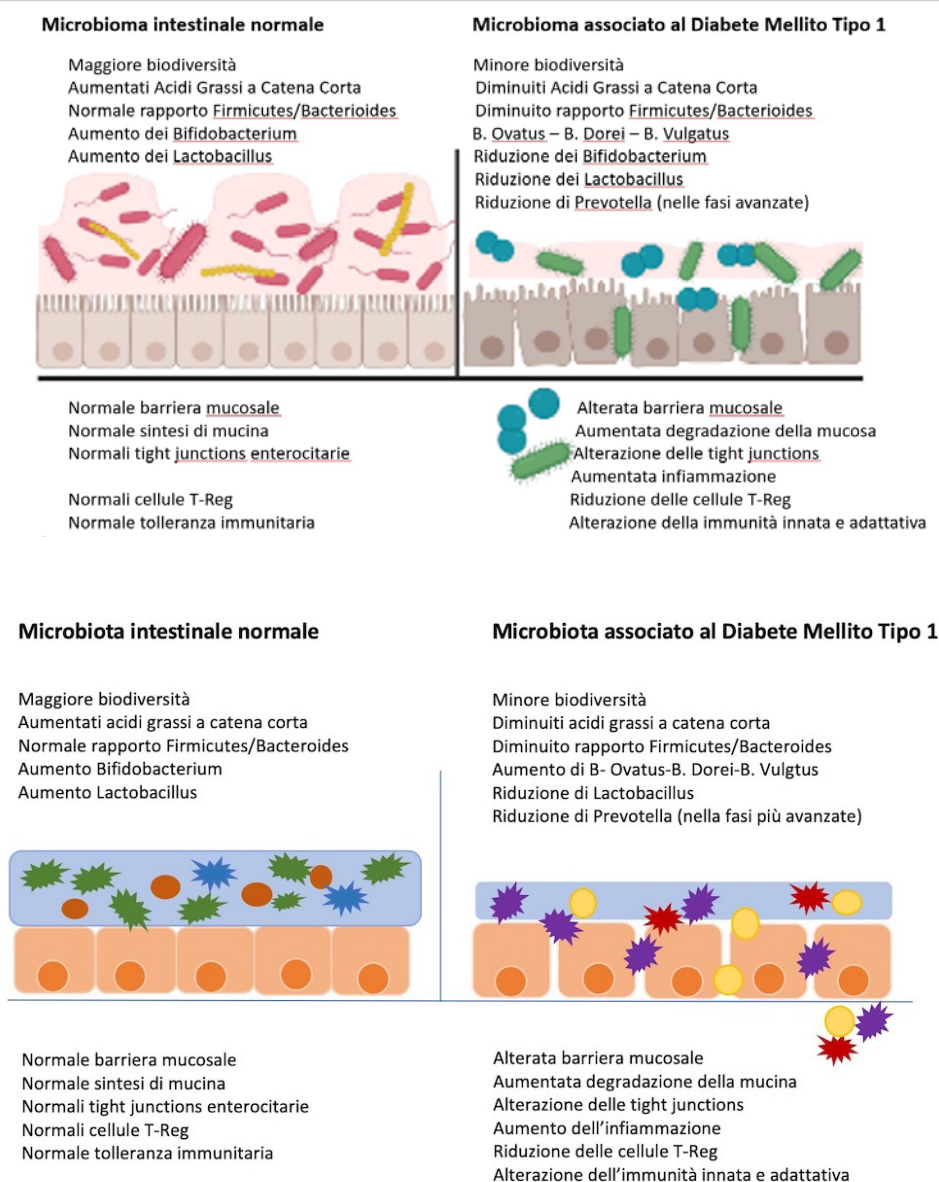
Vari studi indicano che la rottura dell'integrità della barriera intestinale, con conseguente aumento del traffico di antigeni e infiammazione intestinale, precede l'insorgenza di DMT1 ed è direttamente correlata alla sua patogenesi anziché secondaria ad alterazioni metaboliche indotte dal diabete, come l'iperglicemia (51). La disbiosi indurrebbe alterazioni dell'omeostasi immunitaria intestinale con un aumento del rapporto Teff / Treg e un'infiammazione cronica, come osservato nei topi NOD prediabetici (51). Stabilire una relazione causale tra alterazioni del microbiota e autoimmunità è ostacolato dalla complessità dell'interazione sistema immunitario-microbiota. Nel contesto di questa intima relazione, uno squilibrio del microbiota può portare ad autoimmunità in un ospite geneticamente sensibile, incapace di prevenire lo sviluppo di cellule autoreattive (21). L'alterazione della barriera intestinale descritta, potrebbe portare a un passaggio incontrollato nella circolazione sistemica di antigeni microbici e non che mediano direttamente il danno delle cellule beta e/o attivano la risposta autoimmune all'interno dei linfonodi pancreatici (PLN) e del pancreas (51). In alternativa, le cellule T autoreattive potrebbero essere attivate da prodotti batterici a livello intestinale mediante mimetismo molecolare e successivamente viaggiare verso linfonodi e isole pancreatiche per mediare il danno delle cellule beta (51, 8).

Nella figura 1 abbiamo riassunto il ruolo del Microbiota intestinale nel diabete di tipo 1: la riduzione della diversità microbica, e di batteri che producono acidi grassi a catena corta risulta in un'alterazione della permeabilità intestinale e della composizione del muco. Di conseguenza, si sviluppa una infiammazione intestinale di basso grado. L'alterata permeabilità intestinale permette l'anomalo passaggio di antigeni microbici e non attraverso la barriera intestinale nella circolazione sistemica, e questo risulta in un'attivazione del sistema immunitario innato e adattivo che conduce alla patologia autoimmune nei soggetti predisposti.

PROSPETTIVE FUTURE

Considerando il modello patogenetico proposto, sono in fase di studio strategie applicabili nel trattamento della disbiosi associata al diabete mellito di tipo 1, autoimmune (19).

Figura 1 ◆



In un'ottica di prevenzione, sarebbe utile partire dal microbiota materno, dal quale deriva quello dei loro figli. Ad esempio, uno studio ha valutato il consumo materno di carni rosse in relazione ai cambiamenti microbici intestinali, identificando nei loro figli un aumento del rischio di autoimmunità e DMT1 (66). Dominguez-Bello et al. hanno valutato la possibilità di modulare il microbiota intestinale di bambini nati con parto cesareo, esponendoli a un inoculo naturale, ottenuto dal tratto vaginale di donne sane con dominanza di *Lactobacillus*.

Questi bambini ottengono, in tal modo, una composizione intermedia tra i nati per via vaginale e quelli nati con parto cesareo, ma risulta da definire l'effettiva riduzione del rischio di autoimmunità nei bambini suscettibili (67). Un valido strumento è l'uso di probiotici che, nello studio TEDDY, sono stati somministrati nelle prime 4 settimane di vita portando a una riduzione del rischio di autoimmunità del 60% nei soggetti geneticamente predisposti, anche se le modifiche indotte hanno avuto breve durata (68). Tra i probiotici, *Lactobacillus rhamnosus*

GG promuove la maturazione della barriera intestinale mediante induzione dell'espressione di claudina-3 (69), e allo stesso modo agirebbe il probiotico *Lactobacillus plantarum* (70). Interessanti anche i risultati ottenuti sui topi NOD, trattati con gavage orale di campioni fecali ottenuti da topi sani, che mostrano una riduzione del rischio di malattia (8).

Essendo il diabete una malattia immuno-mediata, in alcuni studi, sono stati valutati immunomodulatori, che hanno mostrato solo lievi effetti sul microbiota intestinale, non ancora definiti con precisione, tra questi l'anticorpo monoclonale (mAb) chimerico anti-CD20 (rituximab che agisce sulle cellule B), i mAb anti-CD3 umanizzati (teplizumab e oteplizumab), e altri ancora (8). Nei topi NOD, l'alterazione del microbioma intestinale indotta dal mAb anti-CD3 si associa a aumento delle cellule Tr1 intestinali che producono IL10, riducendo il rischio di DMT1. È interessante notare, però, che le cellule T devono migrare nell'intestino per esercitare la funzione protettiva (8). Promettente è il trapianto di microbiota fecale (FMT), applicato con risultati incoraggianti come terapia sperimentale in diverse patologie, oltre che nella diarrea da *Clostridium difficile*. Il FMT modifica radicalmente il microbiota nel ricevente, ma la tecnica è ancora da definire ed è necessario studiare la modalità di esecuzione più idonea a garantirne l'efficacia e limitare gli effetti collaterali (19). Considerando il "leaky gut" associato alla disbiosi intestinale, si potrebbero proporre, infine, farmaci che ripristinano la mucosa intestinale, come il tannato di gelatina. Quest'ultimo agisce ripristinando una permeabilità fisiologica intestinale, creando un film bioprotettivo e legami con la mucina, inducendo un effetto antinfiammatorio indiretto (66).

CONCLUSIONI

È ormai noto che, prima dell'esordio clinico del diabete mellito autoimmune, si instaura una disbiosi intestinale che favorisce un'alterata permeabilità intestinale insieme ad un'attivazione del sistema immunitario, così che antigeni luminali possano essere traslocati in altri organi, come il pancreas e innescare, in individui suscettibili geneticamente, il processo di distruzione immuno-mediato delle cellule pancreatiche. La possibilità di modulare il microbiota intestinale sembra essere, quindi, un approccio promettente nella prevenzione e terapia del diabete di tipo 1, anche se è ragionevole ipotizzare che

sono necessari ulteriori studi perché tutto questo si possa tradurre nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Xie Z, Chang C, Zhou Z. et al. Molecular mechanisms in autoimmune type 1 diabetes: a critical review. *Clin Rev Allergy Immunol* 47(2): 174-192, 2014. doi: 10.1007/s12016-014-8422-2.
2. Achenbach P, Bonifacio E, Ziegler A et al. Predicting type 1 diabetes. *Current Diabetes Reports* 5: 98-103, 2005. doi:10.1007/s11892-005-0035-y.
3. Tuomilehto J, Ogle GD, Lund-Blix NA, et al. Update on Worldwide Trends in Occurrence of Childhood Type 1 Diabetes in 2020. *Pediatr Endocrinol Rev* 17(1): 198-209, 2020. doi:10.17458/per.vol17.2020.tol.epidemiology-childtype1diabetes.
4. Mobasseri M, Shirmohammadi M, Amiri T, et al. Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis. *Health Promotion Perspectives* 30; 10(2): 98-115, 2020. doi: 10.34172/hpp.2020.18.
5. Kyvik KO, Nystrom L, Gorus F, Songini M, et al. The epidemiology of Type 1 diabetes mellitus is not the same in young adults as in children. *Diabetologia* 47(3): 377-384, 2004.
6. Songini M, Lombardo MC and C, et al. The Sardinian way to Type 1 Diabetes. *Journal of Diabetes Science and Technology* 4(5): 1248-1255, 2010. doi:10.1177/193229681000400526.
7. Nisticò L, Iafusco D, Galderisi A, et al. Emerging Effects of Early Environmental Factors over Genetic Background for Type 1 Diabetes Susceptibility: Evidence from a Nationwide Italian Twin Study. *J Clin Endocrinol Metab* 97(8): 1483-1491, 2012. doi: 10.1210/jc.2011-3457.
8. Zheng P, Zhixia Li, Zhiguang Zhou, et al. Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. *Diabetes Metabolism* 34(7): e3043, 2018. doi:10.1002/dmrr.3043.
9. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature* 562(7728): 583-588, 2018. doi:10.1038/s41586-018-0617-x.
10. Kempainen KM, Ardisson AN, Davis-Richardson AG, et al. Differences in gut microbiota of healthy children and those with type 1 diabetes. *Pediatr Int* 56(3): 336-43, 2014. doi: 10.1111/ped.12243.

11. Heintz-Buschart A, May P, Laczny C, et al. Integrated multi-omics of the human gut microbiome in a case study of familial type 1 diabetes. *Nat Microbiol* 2(16180), 2017. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.180.
12. Mejía-Leon ME, Petrosino JF, Ajamin NJ, et al. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Sci Rep* 4: 3814. 2014. doi: 10.1038/srep03814.
13. Sircana A, Paschetta E, Cassader M, Gambino R. Microbiota intestinale e rischio cardiovascolare. *il Diabete* 31: 161-171, 2019.
14. Kostic AD, Gevers D, Siljander H et al. The Dynamics of the Human Infant Gut Microbiome in Development and in Progression towards Type 1 Diabetes. *Cell Host Microbe* 17(2): 260-273, 2015. doi:10.1016/j.chom.2015.01.001.
15. Chow J, Mazmanian SK, et al. A Pathobiont of the Microbiota Balances Host Colonization and Intestinal Inflammation. *Cell Host & Microbe* 22; 7(4): 265-276, 2010. doi: 10.1016/j.chom.2010.03.004.
16. Qi CJ, Zhang Q, Yu M, et al. Imbalance of Fecal Microbiota at Newly Diagnosed Type 1 Diabetes in Chinese Children. *Chin Med J (Engl)* 129(11): 1298-304, 2016. doi: 10.4103/0366-6999.182841.
17. Kupila A, Muona P, Simell T et al. Feasibility of genetic and immunological prediction of Type I diabetes in a population-based birth cohort. *Diabetologia* 44: 290-297, 2001. doi:10.1007/s001250051616.
18. Giongo A, Gano KA, Crab DB, et al. Toward defining the microbioma autoimmune for type 1 Diabetes. *The ISME Journal* 5: 82-91, 2011. doi:10.1038/ismej.2010.92.
19. Honkanen J, Knip M. Modulation of Type 1 Diabetes Risk by the Intestinal Microbiome. *Curr Diab Rep* 23; 17(11): 105, 2017. doi:10.1007/s11892-017-0933-9.
20. Cinek O, Kramna L, Oikarinen S, et al. Imbalance of bacteriome profiles within the Finnish Diabetes Prediction and Prevention study: Parallel use of 16S profiling and virome sequencing in stool sample from children with islet autoimmunity and matched controls. *Pediatric Diabetes* 18(7): 588-598, 2017. doi: 10.1111/pedi.12468.
21. Paun A, Yau C, Danska JS. The Influence of the Microbiome on Type 1 Diabetes. *The Journal of Immunology* 198(2): 590-595, 2017.
22. Leiva-Gea I, Sánchez-Alcoholado L, Mart B, et al. Gut Microbiota Differs in Composition and Functionality Between Children With Type 1 Diabetes and MODY2 and Healthy Control Subjects: A Case-Control Study Diabetes Care. *Diabetes Care* 41(11): 2385-2395, 2018. doi: 10.2337/dc18-0253.
23. Kiselev D, Matsvay A, Abramov I, et al. Current Trends in Diagnostics of Viral Infections of Unknown Etiology. *Viruses* 12(2): 211, 2020. doi: 10.3390/v12020211.
24. Zhao G, Vatanen T, Droit L, et al. Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(30): 6166-E6175, 2017. doi: 10.1073/pnas.1706359114.
25. Pearson JA, Tai N, Ekanayake-Alper DK, et al. Norovirus Changes Susceptibility to Type 1 Diabetes by Altering Intestinal Microbiota and Immune Cell Functions. *Frontiers in Immunology* 10: 2654, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.0265.
26. Guash-Ferrè M, Hruba A, Toledo E, et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care* 39(5): 833-846, 2016. doi: 10.2337/dc15-2251.
27. Sen P, Dickens AM, López-Bascón MA, et al. Metabolic alterations in immune cells associate with progression to type 1 diabetes. *Diabetologia* 63: 1017-1031, 2020. doi: 10.1007/s00125-020-05107-6.
28. Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger K. et al. Mechanisms of Disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2(9): 406-415, 2005. doi: 10.1038/ncpgasthep0265.
29. Dedrick S, Sundaresh B, Huang Q, et al. The Role of Gut Microbiota and Environmental Factors in Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Frontiers in Endocrinology* 11: 78, 2020. doi: 10.3389/fendo.2020.00078.
30. De Goffau MC, Luopajarvi K, Knip M, et al. Fecal Microbiota Composition Differs Between Children With b-Cell Autoimmunity and Those Without. *Diabetes* 62(4): 1238-1244, 2013. doi: 10.2337/db12-0526.
31. Marino E, Richards JL, McLeod KH et al. Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat Immunol* 18(5): 552-562, 2017.
32. Vatanen T, Franzosa EA, Schwager R, et al. The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature* 562(7728): 589-594, 2018. doi: 10.1038/s41586-018-0620-2.
33. Arneth B, Arneth R, Shams M, et al. Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences* 20(10): 2467, 2019. doi: 10.3390/ijms20102467.

34. Vergès B. Lipid disorders in type 1 diabetes. *Diabetes & Metabolism* 35(5): 353-360, 2009. doi:10.1016/j.diabet.2009.04.004.
35. Balderas C, Rupérez FJ, Ibañez E, et al. Plasma and urine metabolic fingerprinting of type 1 diabetic children. *Electrophoresis* 34(19): 2882-2890, 2013. doi: 10.1002/elps.201300062.
36. Galderisi A, Pirillo P, Moret V, et al. Metabolomics reveals new metabolic perturbations in children with type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes* 19(1): 59-67, 2017. doi:10.1111/pedi.12524.
37. Dutta T, Kudva YC, Persson XM, Schenck LA, et al. Impact of Long-Term Poor and Good Glycemic Control on Metabolomics Alterations in Type 1 Diabetic. *J Clin Endocrinol Metab* 101: 1023-1033, 2016. doi.org/10.121/jc.2015-2640.
38. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444(7122): 1022-3, 2006. doi.org/10.1038/4441022a.
39. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457(7228): 480-4, 2009. doi.org/10.1038/nature07540.
40. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490(7418): 55-60, 2012. doi.org/10.1038/nature11450.
41. Gülden E, Wong FS, and Wen L. The Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin Immunol* 159(2), 143-153, 2015. doi:10.1016/j.clim.2015.05.013.
42. Lee AS, Gibson DL, Zhang Y, et al. Gut barrier disruption by an enteric bacterial pathogen accelerates insulinitis in NOD mice. *Diabetologia* 53(4): 741-748, 2010. doi: 10.1007/s00125-009-1626-y.
43. Kelly CP, Green PH, Murray JA, et al. Larazotide acetate in patients with coeliac disease undergoing a gluten challenge: a randomised placebo-controlled study. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 37(2): 252-262, 2013. doi: 10.1111/apt.12147.
44. Sapone A, De Magistris L, Pietzak M, et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 55(5): 1443-9, 2006. doi: 10.2337/db05-1593.
45. Carratù R, Secondulfo M, de Magistris L, et al. Altered intestinal permeability to mannitol in diabetes mellitus type I. *Pediatr Gastroenterol Nutr* 28(3): 264-9, 1999. doi:10.1097/00005176-199903000-00010.
46. De Magistris L, Secondulfo M, Iafusco D, et al. Altered mannitol absorption in diabetic children. *Ital J Gastroenterol* 28(6): 367, 1996.
47. Watts T, Berti I, Sapone A, Gerarduzzi T, Not T, Zielke R, Fasano A. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8): 2916-2921, 2005. doi: 10.1073/pnas.0500178102.
48. Pellegrini S, Sordi V, Bolla AM, Saita AD, et al. Duodenal Mucosa of Patients With Type 1 Diabetes Shows Distinctive Inflammatory Profile and Microbiota. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 102(5): 1468-1477, 2017. doi: 10.1210/jc.2016-3222.
49. Gavin PG, Mullaney JA, D Loo, et al. Intestinal Metaproteomics Reveals Host-Microbiota Interactions in Subjects at Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 41(10): 2178-2186, 2018. doi: 10.2337/dc18-0777.
50. Maffei C, Martina A, Corradi M, et al. Association between intestinal permeability and faecal microbiota composition in Italian children with beta cell autoimmunity at risk for type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 32(7): 700-709, 2016. doi: 10.1002/dmrr.2790.
51. Sorini C, Cosorich I, Lo Conte M, Steinman L, et al. Loss of gut barrier integrity triggers activation of islet-reactive T cells and autoimmune diabetes. *Stanford University School of Medicine* 116(30): 15140-15149, 2019. doi: 10.1073/pnas.1814558116.
52. Endesfelder D, Hagen M, Winkler C, et al. A novel approach for the analysis of longitudinal profiles reveals delayed progression to type 1 diabetes in a subgroup of multiple-islet-autoantibody-positive children. *Diabetologia* 59(10): 2172-2180, 2016. doi: 10.1007/s00125-016-4050-0.
53. Liu D, Philip T, et al. Toll-like receptor triggering of a Vitamine D-mediated human antimicrobial response. *Science*(311)5768: 1770-1773, 2006.
54. Valladares R, Sankar D, Li N, et al. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats. *PLoS ONE* 5(5): 10507, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0010507.
55. Krieger MA, Sefik E, Hill JA, et al. Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(28): 11548-53, 2011. doi: 10.1073/pnas.1108924108.

56. Li Y, Liu Y, Cong-Qiu Chu. Th17 Cells in Type 1 Diabetes: Role in the Pathogenesis and Regulation by Gut Microbiome. *Hindawi* 2015(5): 7, 2015. doi.org/10.1155/2015/638470.
57. Esposito S, Toni G, Tascini G, et al. Environmental Factors Associated With Type 1 Diabetes. *Frontiers in Endocrinology* 10: 592, 2019. doi: 10.3389/fendo.2019.00592.
58. Han H, Li Y, Fang J, et al. Gut Microbiota and Type 1 Diabetes I. *International Journal of Molecular Sciences* 19(4): 995, 2018. doi: 10.3390/ijms19040995.
59. Vatanen T, Kostic AD, Heli Siljander EH, et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell* 165(4): 842-853, 2016. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.056.
60. Abdillatif AM, et al. Current understanding of the role of gut dysbiosis in type 1 diabetes. *Journal of Diabetes* 11(8): 632-644, 2019. doi: 10.1111/1753-0407.12915.
61. Mullaney JA, Stephens JE, Costello ME, et al. Type 1 diabetes susceptibility alleles are associated with distinct alterations in the gut microbiota. *Microbiome* 6(35), 2018. doi: 10.1186/s40168-018-0417-4.
62. Tastan C, Karthan E, Zhou W, et al. Tuning of human MAIT cell activation by commensal bacteria species and MR1 dependent T cell presentation. *Mucosal Immunol* 11(6): 1591-1605, 2018. doi: 10.1038/s41385-018-0072-x.
63. Magalhaes I, Kiaf B, Lehuen A. iNKT and MAIT cell alterations in diabetes. *Frontiers in immunology* 6: 341, 2015. doi: 10.3389/fimmu.2015.00341.
64. Costantinides MG, Link VM, Tamoutounour S, et al. MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. *Science* 366(64266): 6426, 2019. doi: 10.1126/science.aax6624.
65. Huang J, Pearson JA, Peng J, et al. Gut microbial metabolites alter IgA immunity in type 1 diabetes. *JSI insight*, 2020. doi: 10.1172/jci.insight.135718.
66. Mejía-León ME, ACalderón de la Barca AM, et al. Diet, Microbiota and Immune System in Type 1 Diabetes Development and Evolution. *Nutrients* 7(11): 9171-84, 2015. doi: 10.3390/nu711546.
67. Dominiguez-Bello MG, Blazer MJ, Knight R, et al. Development of the Human Gastrointestinal Microbiota and Insights From High-Throughput Sequencing. *Gastroenterology* 104(6): 1713-1719, 2011. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.011.
68. Uusitalo U, Liu X, Yang J, et al. Association of early exposure of probiotics and islet autoimmunity in the TEDDY study. *JAMA Pediatr* 170: 20-28, 2016. doi: 10.1001/jama-pediatrics.2015.2757.
69. Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, et al. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *The American journal of pathology* 180(2): 626-635, 2012. doi:10.1016/j.ajpath.2011.10.025.
70. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 298(6): 851-859, 2010. doi: 10.1152/ajpgi.00327.2009.
71. Siljander H, Honkanen J, Knip M, et al. Microbiome and type 1 diabetes. *EBioMedicine* 46: 512-521, 2019. doi:10.1016/j.ebiom.2019.06.031.
72. Vehik K, Lynch KF, Wong MC, et al. Prospective virome analyses in young children at increased genetic risk for type 1 diabetes. *Nature medicine* 25: 1865-1872, 2019. doi: 10.1038/s41591-019-0667-0.
73. Craig ME, Kim KW, Isaacs SR, et al. Early-life factors contributing to type 1 diabetes. *Diabetologia* 62: 1823-1834, 2019. doi:10.1007/s00125-019-4942-x.
74. Predieri B, Bruzzi P, Bigi E, et al. Endocrine Disrupting Chemicals and Type 1 Diabetes. *Int J Mol Sci* 21(8): 2937, 2020. doi:10.3390/ijms21082937.