Società Italiana
di Parodontologia e Implantologia

UNIVERSITÀ
DI TORINO

PREMIO "M. CALANDRIELLO" 2026

Università degli Studi di Torino

Odontoiatria e Protesi Dentaria

TESI DI LAUREA

Il microbioma orale e intestinale associato alla parodontite: un'analisi metagenomica mediante shotgun sequencing

Relatore
Prof. Mario Aimetti

Correlatori
Dr. Giacomo Baima
Dr. Federica Romano

Candidato/a
Giacomo Tonello

Indice

Abstract *4*

1. Introduzione *6*

1.1. Il microbioma umano **6**

1.2. Il microbioma intestinale **7**

1.2.1. Composizione del microbiota intestinale 8

1.2.2. Fattori ambientali che influenzano il microbioma intestinale 9

1.2.3. Funzioni del microbiota intestinale 10

1.2.4. Disbiosi intestinale e malattie umane 13

1.3. Il microbiota orale **15**

1.3.1. Composition of oral microbiota 15

1.3.2. Disbiosi e malattie orali 16

1.4. L'oral-gut axis **17**

1.4.1. Vie di traslocazione e colonizzazione intestinale dei batteri orali 17

1.4.2. Parodontite e disbiosi intestinale 19

1.4.3. L'*oral-gut axis* nei modelli preclinici 20

1.4.4. L'*oral-gut axis* nell'uomo 21

2. Obiettivo *22*

3. Materiali e Metodi *23*

3.1. Popolazione di studio 23

3.2. Procedure cliniche 24

3.3. Raccolta, processamento e conservazione dei campioni biologici 24

3.4. Procedure pre-analitiche 25

3.5. Analisi metagenomiche 25

3.6. Analisi statistiche 26

3.6.1. Statistica descrittiva 26

3.6.2. Comparazione tra i gruppi 26

3.6.3. Regressione logistica 27

4. Risultati *28*

4.1. Caratteristiche della popolazione e regressione logistica 28

4.2. Differenze nel profilo tassonomico globale 30

4.3. Taxa differenzialmente abbondanti 31

4.4. Specie condivise tra cavità orale e intestino 34

5. Discussione *36*

6. Conclusioni *40*

Bibliografia *41*

Abstract

Obiettivi: la cavità orale rappresenta il principale accesso al tratto gastro-enterico e può costituire un rilevante *reservoir* di patobionti intestinali. In condizioni fisiologiche, i microbiomi orale e intestinale mantengono un equilibrio omeostatico, pur rimanendo ben distinti tra loro; tuttavia, evidenze crescenti suggeriscono che i batteri orali associati alla parodontite possano determinare alterazioni dell'ecosistema orale, come quelle osservate nella parodontite, attraverso la traslocazione enterale di microorganismi provenienti dal cavo orale, veicolati dalla saliva deglutita o attraverso il circolo ematico. L'obiettivo del presente studio è stato quello di caratterizzare il microbioma orale e intestinale associati alla parodontite severa mediante un approccio metagenomico comparativo, analizzando differenti campioni biologici al fine di esplorare le possibili interazioni lungo l'asse oro-intestinale e identificare eventuali firme microbiche condivise tra i due distretti.

Materiali e metodi: dopo un esame parodontale *full-mouth* eseguito da parte di due operatori esperti e calibrati, sono stati raccolti campioni di placca sottogengivale, saliva non stimolata e feci in pazienti affetti da parodontite di stadio III generalizzato e IV (n=39) e in controlli parodontalmente sani appaiati per età e sesso (n=23). I campioni sono stati sottoposti a whole-genome sequencing mediante *metagenomic shotgun sequencing* consentendo un'analisi tassonomica e funzionale ad alta risoluzione. Le variabili continue sono state descritte come media ± deviazione standard, mentre le variabili categoriche come frequenze e percentuali. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante il *t*-test (dati continui) e il test χ^2 (dati categorici). I perdittori indipendenti della parodontite sono stati identificati tramite un modello di regressione logistica multivariate.

Risultati: l'analisi metagenomica ha evidenziato profili microbici distinti tra il distretto orale e quello intestinale, confermando la segregazione ecologica tra i due habitat. Tuttavia, nei campioni fecali è stata documentata la presenza di tracce di batteri tipicamente orali. La parodontite, inoltre, è risultata essere associata a un aumento significativo della diversità microbica nella placca dei siti patologici e a un arricchimento di specifici patobionti orali. Nei pazienti affetti da parodontite, la saliva e le feci presentavano livelli più elevati di batteri tipicamente patogeni, mentre nei soggetti sani predominavano microrganismi commensali associati all'omeostasi orale e intestinale. Le specie comuni al distretto orale e intestinale

differivano significativamente tra i gruppi, suggerendo che la parodontite possa favorire la condivisione di specifici microrganismi orali verso l'intestino, contribuendo potenzialmente allo sviluppo di uno stato di disbiosi.

Conclusioni: nel complesso, sono state identificate delle impronte genomiche distintive associate alla parodontite nei compartimenti orale e intestinale, a supporto dell'ipotesi di una traslocazione oro-intestinale di specifici batteri in soggetti con malattia parodontale non controllata. I risultati evidenziano la presenza di firme disbiotiche condivise tra i diversi distretti, rafforzando il concetto dell'esistenza di un continuum microbiologico e immunologico lungo l'asse oro-intetinale. sottolineando il possibile impatto intestinale e sistemico dell'infiammazione parodontale. Ulteriori studi longitudinali e funzionali saranno necessari per chiarire i meccanismi causali alla base di questa interazione e per valutare le potenziali implicazioni cliniche. Questo potrebbe favorire nuove prospettive traslazionali, favorendo lo sviluppo di strumenti diagnostici, anche *chairside*, per l'identificazione precoce del rischio microbico e l'adozione di strategie terapeutiche mirate alla gestione della malattia parodontale.

1. Introduzione

1.1. Il microbioma umano

Negli ultimi anni sono stati pubblicati quasi 200.000 lavori scientifici in cui il termine "microbioma" compare nel titolo o nell'abstract, a partire dalla sua introduzione nel 2001 da parte di Lederberg e McCray nel commento intitolato "*Ome sweet-omics: a genealogical treasury of words*"[1]. Le prime evidenze in questo ambito derivavano prevalentemente da studi trasversali, volti ad analizzare il microbiota in diversi distretti corporei e le sue associazioni con marcatori di malattia e specifiche condizioni patologiche.

Al contrario, studi più recenti, tra cui l'*Earth Microbiome Project*[2], o lo *Human Microbiome Project*[3] e l'avvento delle moderne tecniche di Next-generation sequencing (NGS)[4], hanno permesso importanti progressi nella comprensione delle associazioni genomiche, delle interazioni con il patrimonio genetico dell'ospite e nell'identificazione dei patogeni microbici.

La ricerca attuale è principalmente orientata allo studio delle caratteristiche funzionali e dei meccanismi del microbioma, nonché delle differenze nella sua composizione.

Evidenze recenti provenienti da studi epidemiologici, fisiologici e basati su tecnologie *omics*, integrate da indagini cellulari e studi preclinici su modelli animali, indicano che una quota significativa degli effetti sulla salute umana, sull'omeostasi degli organi e sulla suscettibilità alle malattie possa essere mediata o modulata dalle comunità microbiche.[5] Queste, costituiscono il cosiddetto "microbiota umano" e comprendono un'ampia e diversificata comunità di microrganismi, tra cui batteri, *Archea*, batteriofagi, virus eucariotici e funghi, che interagiscono tra loro e colonizzano le superfici corporee e tutte le cavità dell'organismo umano.[5]

Il patrimonio genetico complessivo di tutti i microrganismi presenti in un individuo - definito "microbioma" - supera quello del genoma umano di oltre un ordine di grandezza. In sinergia con queste comunità microbiche simbiotiche, l'organismo umano si configura come un sistema dinamico, un "superorganismo" definito *olobionte*, in cui ospite e microbiota operano come un'entità biologica integrata.[5,6]

È ormai evidente che, nell'uomo, la colonizzazione da parte delle comunità microbiche non è un processo casuale; al contrario, questi microrganismi si sono coevoluti con l'ospite nel corso

di milioni di anni. Il processo di coevoluzione è evidente nelle notevoli analogie tra la composizione e l'organizzazione del microbioma umano e quelle di altri mammiferi, a testimonianza di una relazione simbiotica consolidata nel tempo.[7] Nell'uomo, questo processo di coevoluzione ha determinato anche sottili ma significative variazioni nella composizione del microbioma tra diversi gruppi etnici. Il patrimonio genetico delle comunità microbiche ci ha accompagnato nel corso delle migrazioni a partire dall'Africa - la culla dell'umanità - ed è stato utilizzato, insieme ai marcatori genetici umani, per ricostruire le ancestrali rotte migratorie su scala globale.[6] Nel corso della storia umana, i cambiamenti ambientali e culturali hanno costantemente plasmato il microbioma, con modificazioni particolarmente marcate durante il periodo neolitico, la Rivoluzione Industriale e l'epoca contemporanea. Il controllo del fuoco, l'avvento dell'agricoltura e il crescente consumo di alimenti processati - in particolare zuccheri raffinati - hanno contribuito a modellarne la composizione. Più recentemente, l'ampio utilizzo di terapie antimicrobiche ha ulteriormente alterato questo complesso ecosistema microbico, evidenziando la stretta interazione tra il progresso umano e le comunità microbiche che vi abitano.[8]

Esistono solide evidenze che le comunità microbiche residenti svolgano funzioni metaboliche essenziali negli animali da almeno 500 milioni di anni.[9] Di fatto, il microbiota umano svolge un ruolo fondamentale in numerose funzioni metaboliche, fisiologiche e immunologiche. In particolare, come sintetizzato da Kilian *et al.*, esso contribuisce a: la differenziazione e la maturazione delle mucose e del sistema immunitario dell'ospite; la digestione degli alimenti e l'assimilazione dei nutrienti; la produzione di energia e la modulazione dei meccanismi di accumulo lipidico; la regolazione dell'omeostasi metabolica; la detossificazione e il metabolismo di sostanze chimiche ambientali e xenobiotici; il mantenimento dell'integrità funzionale della cute e delle barriere mucose (omeostasi di barriera); la regolazione dello sviluppo del sistema immunitario e l'ottimizzazione della sua risposta, garantendo un equilibrio tra processi pro-infiammatori e anti-infiammatori; la prevenzione dell'invasione e della proliferazione di microrganismi patogeni (resistenza alla colonizzazione).[6]

1.2. Il microbioma intestinale

La grande maggioranza dei microrganismi che colonizzano il corpo umano si localizza principalmente a livello intestinale, dove circa un migliaio di specie microbiche costituisce una complessa comunità ecologica nota come microbiota intestinale[10]. La sua composizione è

influenzata da diversi fattori, tra cui la modalità di nascita, l'alimentazione nei primi anni di vita, lo stile di vita, l'assunzione di farmaci e il patrimonio genetico dell'ospite.[5,11]

1.2.1. Composizione del microbiota intestinale

Il microbiota intestinale è composto da sei principali phyla batterici: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*, con *Firmicutes* e *Bacteroidetes* che rappresentano i gruppi predominanti.[12] Inoltre, il microbiota intestinale umano comprende una vasta gamma di virus eucariotici, batteriofagi e archea.[13,14]

Tuttavia, una definizione precisa di un microbiota intestinale sano non è ancora stata stabilita a un livello tassonomico globale. La distribuzione dei batteri intestinali è peculiare per ciascun individuo ed è influenzata, almeno in parte, da variazioni a livello di ceppo microbico, da differenze nei tassi di proliferazione e da varianti strutturali nei geni batterici.[15–17] Inoltre, marcate differenze interindividuali nelle esposizioni ambientali e nel patrimonio genetico dell'ospite contribuiscono ulteriormente a modellare tale distribuzione.[18] Tuttavia, le comunità microbiche intestinali sane sono generalmente caratterizzate da un'elevata diversità tassonomica, da un ricco contenuto genico microbico e da nuclei funzionali stabili.[17] È però fondamentale sottolineare che un'elevata diversità e ricchezza batterica, da sole, non rappresentano indicatori oggettivi dello stato di salute del microbiota. La sua composizione può infatti essere influenzata da numerosi fattori, tra cui la genetica, il distretto anatomico e il tempo di transito intestinale, la modalità di nascita e l'allattamento, l'età e i fattori ambientali.[11]

Goodrich *et al*. hanno dimostrato che le variazioni genetiche dell'ospite contribuiscono alla diversità fenotipica, rafforzando il concetto che il microbioma umano, così come l'abbondanza relativa di diverse specie e phyla batterici, sia influenzato da fattori genetici.[19]

La composizione del microbiota intestinale varia lungo i diversi segmenti anatomici del tratto gastrointestinale, in relazione alle differenti condizioni ambientali. Ad esempio, l'intestino tenue, caratterizzato da una lunghezza ridotta e da un'elevata concentrazione di bile, rappresenta un ambiente nettamente diverso rispetto al colon, dove un tempo di transito più lento e un pH più neutro favoriscono la proliferazione di comunità microbiche anaerobie più abbondanti.[13]

Inoltre, la modalità di nascita e l'esposizione precoce all'allattamento svolgono un ruolo cruciale nel modellare il microbiota intestinale del neonato, che continua a svilupparsi progressivamente durante l'infanzia in risposta a molteplici fattori ambientali.

Successivamente, il microbiota intestinale tende a mantenersi relativamente stabile nel corso della tarda infanzia, dell'adolescenza e dell'età adulta. Tuttavia, con l'avanzare dell'età, si osserva frequentemente una riduzione della diversità microbica, probabilmente correlata, almeno in parte, a modificazioni della funzione immunitaria dell'ospite. [20,21]

1.2.2. Fattori ambientali che influenzano il microbioma intestinale

I dati del *Human Microbiome Project* indicano che, nei soggetti adulti, un microbioma non perturbato può mantenersi relativamente stabile nel breve periodo e presenta un certo grado di resilienza. Tuttavia, diversi fattori ambientali, tra cui dieta e alimentazione, attività fisica, fumo e assunzione di farmaci, possono influenzare il microbioma intestinale.[22]

La dieta vegetariana, le diete ricche di fibre e la dieta mediterranea hanno dimostrato di esercitare effetti benefici sul microbioma intestinale, favorendo un aumento delle popolazioni di *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. In particolare, l'elevato contenuto di fibre di questi regimi alimentari costituisce un substrato nutrizionale per la fermentazione batterica intestinale, promuovendo ulteriormente la diversità microbica e la stabilità genomica.[13,14,23,24]

L'attività fisica ha dimostrato di influenzare positivamente la composizione del microbiota intestinale. Numerosi studi indicano infatti che gli atleti tendono a presentare livelli più bassi di marcatori infiammatori e un minor rischio di disbiosi intestinale.[25–28]

Il fumo rappresenta un ulteriore fattore documentato in grado di influenzare significativamente la composizione del microbioma intestinale. L'esposizione al tabacco e ai suoi derivati è stata associata, a livello della microflora cecale, a una maggiore abbondanza di *Clostridium* spp. e a una riduzione dei livelli di *Lactococcus* spp., *Ruminococcus* spp. ed *Enterobacteriaceae*. Inoltre, i fumatori attivi tendono a presentare una maggiore proporzione di *Bacteroidetes* e livelli ridotti di *Firmicutes* e *Proteobacteria* rispetto ai non fumatori. Lo stato di fumatore è inoltre associato a modificazioni del microbioma intestinale: Bidermann et al. hanno osservato che soggetti sani sottoposti a cessazione del fumo mostravano un aumento di *Firmicutes* e *Actinobacteria*, accompagnato da una riduzione di *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*.[14,29,30]

Per quanto riguarda l'assunzione di farmaci, le evidenze indicano che diversi medicinali sono in grado di influenzare la composizione del microbioma intestinale. Gli antibiotici possono alterare il microbioma principalmente attraverso due meccanismi: da un lato, eliminando microrganismi benefici e favorendo così uno stato di disbiosi; dall'altro, interferendo con i meccanismi mediante i quali tali microrganismi inibiscono la proliferazione di patogeni. [31,32]

Questi effetti collaterali sono strettamente associati al tipo di antibiotico utilizzato, in particolare agli antibiotici ad ampio spettro, nonché alla durata del trattamento.[14] I composti maggiormente implicati sembrano essere la clindamicina, più frequentemente associata a colite pseudomembranosa da *Clostridium difficile*, insieme a claritromicina, ciprofloxacina e vancomicina, tutte responsabili di una riduzione della diversità di *Bacteroidetes* e *Ruminococcaceae*.[14,33–35] Anche altri farmaci non antibiotici sono stati associati a perturbazioni del microbioma intestinale e allo sviluppo di disbiosi. Sulla base dei risultati degli studi di Falony *et al*. e Jackson *et al*., i farmaci più frequentemente coinvolti includono statine, lassativi, metformina, ACE-inibitori, antidepressivi e inibitori della pompa protonica. [36,37] Ad esempio, questi ultimi possono modificare la composizione del microbioma intestinale, favorendo la colonizzazione di taxa patogeni quali *Clostridium difficile* e specie di *Salmonella*. [14,38,39] Al contrario, la metformina, un ipoglicemizzante orale ampiamente utilizzato nel trattamento del diabete di tipo 2, può aumentare i livelli di *Escherichia coli* e ridurre quelli di *Intestinibacter* spp., contribuendo allo sviluppo di uno stato di disbiosi.[14,40,41]

1.2.3. Funzioni del microbiota intestinale

Il microbiota intestinale è stato recentemente riconosciuto come un vero e proprio "organo vitale", in virtù delle sue estese interazioni bidirezionali con diversi organi attraverso vie neurali, endocrine, immunologiche e metaboliche.[42] In condizioni di salute, i microrganismi coesistono con l'ospite in una relazione simbiotica, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi attraverso la regolazione del metabolismo dei nutrienti, la difesa nei confronti dei patogeni e la modulazione dei segnali diretti alle cellule immunitarie, a sostegno delle funzioni fisiologiche e delle risposte dell'immunità.[43]

Al contrario, un'alterazione dell'equilibrio di questo ecosistema microbico non solo è associata a disturbi gastro-enterici, ma può anche contribuire allo sviluppo di patologie extra-intestinali.[44]

Funzioni metaboliche

In primo luogo, la microflora intestinale svolge un ruolo metabolico fondamentale, grazie alla sua capacità di degradare le fibre alimentari non digerite dagli enzimi dell'ospite a livello dell'intestino tenue.[45] In particolare, polisaccaridi complessi e zuccheri semplici costituiscono i principali substrati metabolici del microbiota intestinale. Le specie batteriche commensali, soprattutto appartenenti ai phyla *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, sono capaci di fermentare tali composti non digeribili, generando acidi grassi a catena corta e ramificata (SCFA), insieme a

lattato, etanolo, idrogeno e anidride carbonica.[44] Attraverso questo processo, il microbiota intestinale contribuisce alla produzione di energia supplementare.

Gli SCFA, in particolare, sono stati ampiamente studiati e i loro effetti sulla salute risultano ben documentati.[46–48] In effetti, questi composti regolano un'ampia gamma di vie metaboliche, sia a livello intestinale sia in tessuti distanti, quali il parenchima epatico, il tessuto adiposo, i muscoli e il cervello.[49] Dal punto di vista molecolare, tali metaboliti microbici interagiscono con i recettori accoppiati a proteine G 41 e 43 (GPR41 e GPR43), espressi sulle cellule enteroendocrine L. Questa interazione promuove la secrezione del peptide glucagone-simile 1 (GLP-1) e del peptide YY (PYY), i quali svolgono un ruolo chiave nella regolazione di molteplici funzioni metaboliche.[50]

Acetato, propionato e butirrato rappresentano i principali acidi grassi a catena corta (SCFA) rilevati nei campioni fecali umani, ciascuno dei quali svolge un ruolo distinto in diverse funzioni fisiologiche.[51] In particolare, Cani et al. hanno evidenziato come il propionato costituisca una fonte energetica rilevante per le cellule epiteliali epatiche e svolga un ruolo importante nel processo di gluconeogenesi.[52] L'acetato, invece, contribuisce al mantenimento dell'eubiosi intestinale stimolando la crescita di batteri benefici e agendo come cofattore essenziale.[44] Il butirrato è probabilmente lo SCFA più rilevante per la salute umana, rappresentando la principale fonte energetica per i colonociti.[53] Inoltre, può esercitare effetti anticarcinogenici promuovendo l'apoptosi nelle cellule tumorali del colon e modulando epigeneticamente l'espressione genica attraverso l'inibizione delle istone deacetilasi.[44,54,55] Infine, il butirrato contribuisce al mantenimento dell'ambiente anaerobio del colon - condizione essenziale per preservare l'eubiosi intestinale - stimolando la β-ossidazione mitocondriale e attivando il recettore nucleare *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* (PPARγ).[49]

Inoltre, il microbiota intestinale contribuisce in modo significativo alla sintesi di diverse vitamine.[56,57] La comunità microbica intestinale è in grado di sintetizzare vitamine chiave, tra cui tiamina (B1), riboflavina (B2), acido folico (B9), cobalamina (B12) e menachinone (K2). Tali vitamine rivestono un ruolo essenziale in numerosi processi fisiologici e molecolari, inclusi l'eritropoiesi, la replicazione e la riparazione del DNA, l'attività cofattoriale enzimatica e il mantenimento della funzione immunitaria.[44,58,59]

Altri metaboliti derivati dal microbiota intestinale comprendono acidi biliari secondari, quali l'acido desossicolico (DCA) e l'acido litocolico (LCA), coinvolti nella regolazione dell'omeostasi degli acidi biliari e del metabolismo di colesterolo, lipidi, glucosio ed energia.

Inoltre, tali metaboliti esercitano attività antimicrobica e modulano la fisiologia dell'ospite attraverso l'attivazione di recettori nucleari e l'interferenza con le vie di segnalazione cellulare.[60]

Al contrario, la disbiosi intestinale è spesso associata a un aumento del tempo di transito intestinale, che determina uno spostamento metabolico della microflora verso una maggiore attività proteolitica. Di conseguenza, vengono prodotti diversi metaboliti associati alla malattia, tra cui acidi grassi a catena ramificata (BCFA), trimetilammina N-ossido (TMAO), colina, acidi organici e gas quali solfuro di idrogeno (H_2S) e anidride carbonica (CO_2).[11]

Funzioni strutturali e protettive

In condizioni fisiologiche, il microbioma intestinale svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità e della stabilità della barriera epiteliale intestinale.[14,61] Ciò è principalmente mediato dalla secrezione di SCFA, che forniscono un apporto energetico supplementare agli enterociti, e di poliamine, quali putrescina, spermidina e spermina, che contribuiscono a mantenere un elevato tasso proliferativo delle cellule epiteliali intestinali.[62–65]

Funzioni immunitarie

Il microbioma intestinale riveste inoltre un ruolo essenziale nella regolazione delle risposte immunitarie locali e sistemiche; studi recenti evidenziano come la sua precoce instaurazione sia cruciale per il mantenimento dell'omeostasi immunitaria e per la prevenzione di patologie autoimmuni.[14,44,66–70] Diversi approcci sperimentali, tra cui modelli *germ-free* (GF), sono stati utilizzati per dimostrare il ruolo cruciale del microbiota intestinale nello sviluppo del sistema immunitario innato e adattativo.[71]

In primo luogo, la comunità microbica intestinale riveste un ruolo essenziale nello sviluppo del tessuto linfoide associato all'intestino (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT), modulando i fenotipi cellulari pro- e antinfiammatori e contribuendo al mantenimento dell'integrità della barriera intestinale attraverso la stimolazione della secrezione di muco e la sintesi di peptidi antimicrobici.[14,72]

Inoltre, il microbiota residente, inclusi i patobionti, modula la differenziazione dei linfociti T helper $CD4^+$ nei sottotipi Th1, Th2 e Th17, nonché nelle cellule T regolatorie (Treg), attraverso la produzione di metaboliti. In particolare, i batteri filamentosi favoriscono l'espansione delle cellule Th17 e Th1, mentre i *Clostridiales* promuovono la differenziazione delle Treg e la produzione dell'interleuchina-10 (IL-10), una citochina ad attività antinfiammatoria. Tuttavia, una iperattivazione delle cellule Th1 e Th2 indotta da disbiosi può comportare un'eccessiva produzione di citochine pro-infiammatorie.[14,73]

Inoltre, Wu & Wu hanno pubblicato una revisione in cui evidenziano come le cellule presentanti l'antigene (APC), coevolute con il microbiota intestinale, siano dotate della capacità di proteggere l'organismo dalle infezioni, preservando al contempo la tolleranza immunitaria nei confronti della comunità microbica residente.[74]

Al contrario, numerosi studi hanno dimostrato come la disbiosi intestinale sia associata a un ampio spettro di patologie autoimmuni, sia intestinali sia extra-intestinali, tra cui la sclerodermia sistemica.[75]

1.2.4. Disbiosi intestinale e malattie umane

Come precedentemente discusso, la composizione del microbiota intestinale è caratterizzata da un'elevata variabilità, considerata una normale caratteristica fisiologica in condizioni di eubiosi. Tuttavia, risulta spesso difficile distinguere se tali variazioni siano vantaggiose o dannose. È ormai ampiamente riconosciuto che una perturbazione patologica della comunità microbica intestinale, definita disbiosi intestinale, abbia implicazioni rilevanti nello sviluppo di patologie sia intestinali sia extra-intestinali.[76]

Sebbene questo ambito di ricerca sia ancora nelle sue fasi embrionali, stanno emergendo studi promettenti che dimostrano un significativo potenziale nel trasformare non solo la comprensione della patogenesi delle malattie, ma anche gli approcci terapeutici.[44]

Malattie intestinali

Several studies have identified alterations in the composition of gut microbiota in subjects affected by irritable bowel syndrome (IBS) compared to healthy individuals. These include an increased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio, a reduction in certain *Firmicutes* families (*Lactobacilli* and *Faecalibacterium*) and *Actinobacteria* populations (*Bifidobacteria* and *Collinsella*), as well as an elevation in specific *Firmicutes* families (*Veillonella*, *Streptococci*, and *Ruminococcus spp.*) and *Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae spp.*).[77,78]

Frank et al. reported a reduction in *Lachnospiraceae* and *Bacteroidetes* populations, along with an increase in Proteobacteria families, in the gut microbiota of patients with inflammatory bowel diseases (IBDs), with some differences between Chron's disease (CD) and ulcerative colitis (UC).[79,80]

Structural differences in the fecal microbiota between colorectal cancer (CRC) patients and healthy individuals have been observed, with the gut microbiota of CRC patients showing an increased abundance of *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella spp.*,

Streptococcus and *Peptostreptococcus spp.*, while being depleted of *Roseburia* and other butyrate-producing bacteria from the *Lachnospiraceae* family.[81] Furthermore, genomic analyses conducted in several studies have revealed a link between *Fusobacterium* spp. and CRC, with the bacterium also promoting chemoresistance.[82–84]

Variations in the gut microbiota may contribute significantly to the development of celiac disease (CD), with dysbiosis being associated with an inflammatory intestinal environment in individuals with the condition. As a matter of fact, the onset of CD is driven by the interaction of gluten, genetic background, and environmental factors, such as the intestinal microbial composition. [76,85]

Malattie metaboliche

Evidenze recenti, ottenute sia nell'uomo sia in modelli murini, indicano che alterazioni nella composizione del microbiota intestinale possano contribuire allo sviluppo dell'obesità.[44,86] In particolare, alcune specie microbiche, dette "obesogeniche", tra cui *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Rhizobium*, *Lactococcus* e *Clostridium* spp., sono state associate a un aumento della suscettibilità allo sviluppo dell'obesità.[87]

Larsen *et al.* hanno evidenziato come la composizione del microbiota intestinale sia alterata nei soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2 (DM2).[88] Ad esempio, uno studio di associazione metagenomica su scala genomica, condotto sul microbiota intestinale di pazienti cinesi con DM2, ha evidenziato una riduzione dei batteri produttori di butirrato, quali *Roseburia* spp., insieme a un incremento di patogeni opportunisti, tra cui *Clostridium* spp. Inoltre, è stato riscontrato un arricchimento di funzioni microbiche correlate alla riduzione dei solfati, in particolare attribuibili a specie della famiglia *Desulfovibrionaceae.*[89]

Disordini neurologici

Il cervello e l'intestino sono strettamente interconnessi attraverso l'asse encefalo-intestinale, che media una comunicazione bidirezionale tra il sistema nervoso centrale (SNC), il sistema nervoso enterico e il tratto gastrointestinale.[76]

Uno studio condotto da Cattaneo *et al.* ha evidenziato che un aumento dell'abbondanza di *Escherichia/Shigella* e una riduzione dei livelli di *E. rectale* possono essere associati a una risposta infiammatoria periferica in soggetti con deficit cognitivi e amiloidosi cerebrale, un fattore patogenetico chiave nella malattia di Alzheimer (AD).[90] Un altro studio ha confrontato il microbiota intestinale di pazienti affetti da malattia di Alzheimer con quello di soggetti sani, evidenziando una riduzione significativa della diversità microbica nei primi.[91]

Inoltre, la disbiosi intestinale è stata correlata a un maggior sviluppo di encefalopatia epatica e di diversi disturbi dello spettro autistico.[92,93]

1.3. Il microbiota orale

Sebbene il microbiota intestinale sia stato oggetto delle indagini più approfondite, comunità microbiche colonizzano numerosi altri distretti dell'organismo, tra cui la cavità orale, il tratto respiratorio superiore e i polmoni, le vie urinarie, la vagina e la cute. Tra questi, il microbiota orale rappresenta la seconda comunità microbica per estensione nell'organismo umano.

1.3.1. Composition of oral microbiota

A partire dalle pionieristiche osservazioni di Antonie van Leeuwenhoek, che nel 1670, grazie a un microscopio di propria costruzione, descrisse per la prima volta la presenza di microrganismi, da lui denominati "animaletti", nella placca dentale, la composizione e la diversità del microbiota orale sono state oggetto di numerose ricerche.[94]

Ad oggi, oltre 770 specie batteriche sono state identificate nei diversi microambienti della cavità orale, tra cui le superfici dentarie, il compartimento sottogengivale, la lingua, le labbra, il palato duro e molle e le cripte tonsillari.[95] Questi habitat corrispondono a distinti nicchie ecologiche, ciascuna caratterizzata da condizioni specifiche, quali le caratteristiche del substrato e i gradienti di ossigeno e nutrienti, che influenzano la colonizzazione e la proliferazione microbica.[96]

Nel complesso, secondo l'*Expanded Human Oral Microbiome Database* (eHOMD), la maggior parte delle specie batteriche della cavità orale appartiene a un numero limitato di generi distribuiti in sette principali phyla: *Actinomycetota*, *Bacteroidota*, *Firmicutes* (noti anche come *Bacillota*), *Fusobacteriota*, *Spirochaetota*, *Proteobacteria* (noti anche come *Pseudomonadota*) e *TM7* (*Saccharibacteria*).[95]

Piuttosto che presentarsi in forma planctonica, i batteri della cavità orale si organizzano prevalentemente in comunità multispecie strutturalmente e funzionalmente coordinate, aderenti alle superfici dure e molli, note come biofilm. All'interno di queste, i microrganismi instaurano interazioni metaboliche cooperative, scambi orizzontali di materiale genetico e complessi meccanismi di segnalazione, potenziando la loro capacità di colonizzazione e di competizione con altre specie microbiche.[97] Anche nella saliva, i batteri tendono a organizzarsi in aggregati polimicrobici metabolicamente attivi, evidenziando un'elevata capacità di cooperazione funzionale.[98] Inoltre, recenti avanzamenti nella ricerca sul microbioma orale hanno messo in luce l'organizzazione spaziale (microbiogeografia) dei biofilm orali.[99]

Inoltre, la progressiva riduzione dei costi delle tecniche di sequenziamento, unitamente ai progressi nella potenza computazionale e allo sviluppo di avanzati strumenti bioinformatici, ha promosso l'ampia diffusione delle analisi metagenomiche e metatranscrittomiche, rivelando come il microbioma orale comprenda non solo una vasta diversità di batteri, ma anche virus, funghi, protozoi e archea.[100]

1.3.2. Disbiosi e malattie orali

Il microbiota orale riveste un ruolo essenziale nel mantenimento della salute orale, in quanto strettamente associato alle più comuni patologie del cavo orale, quali la carie dentale e la malattia parodontale. Tali condizioni derivano da complesse interazioni tra le comunità microbiche, la risposta immunitaria dell'ospite e i fattori ambientali.

Carie dentale

La carie dentale è una delle patologie croniche più diffuse a livello mondiale ed è caratterizzata da un'eziologia multifattoriale. Essa insorge a seguito di una perturbazione ecologica del microbioma orale normalmente in equilibrio, caratterizzata da un aumento dell'abbondanza di batteri acidogeni e acido-tolleranti, quali *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.[101,102]

Parodontite

La parodontite è definita come una malattia infiammatoria cronica e multifattoriale che interessa i tessuti di supporto del dente - in particolare gengiva, legamento parodontale e osso alveolare - ed è associata a uno stato di disbiosi del biofilm della placca orale.[103] Secondo i dati epidemiologici riportati in letteratura, la prevalenza globale della parodontite supera il 50% della popolazione, mentre le forme più severe interessano circa l'11,2% degli individui.[104–106] La parodontite severa rappresenta una rilevante problematica di sanità pubblica, contribuendo in maniera significativa al *global burden* associato alle malattie croniche. Essa costituisce la sesta malattia cronica non trasmissibile (NCD) più diffusa a livello mondiale ed è la principale causa di perdita dentaria negli adulti.[107,108]

Come precedentemente descritto, la parodontite è associata a una condizione nota come disbiosi orale. Fin dalle prime descrizioni basate su metodi colturali, le comunità microbiche coinvolte nella parodontite sono state ampiamente studiate, consentendo di caratterizzarne la prevalenza, l'abbondanza e, in alcuni casi, l'attività biologica. Nel 1998, Sigmund Socransky propose una classificazione del microbiota sottogengivale in cinque principali complessi, fornendo un contributo determinante alla comprensione dell'eziologia microbica della parodontite. Nel suo lavoro *"Microbial complexes in subgingival plaque"*, identificò i

principali patogeni parodontali, tra cui *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema* spp., *Tannerella forsythia*, *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp. e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.[109] I successivi avanzamenti nella ricerca sul microbioma orale hanno ulteriormente ampliato queste conoscenze, rivelando la presenza di patogeni recentemente riconosciuti, quali *Filifactor alocis*, *Peptoanaerobacter stomatis* e *Saccharibacteria*.[100,110] Studi recenti hanno identificato anche un viroma associato alla parodontite precedentemente non descritto, sottolineando ulteriormente la complessità dell'ecosistema microbico coinvolto nella malattia.[111]

Inoltre, la parodontite è stata correlata a un ampio spettro di malattie croniche non trasmissibili (NCD) attraverso molteplici vie patogenetiche, tra cui la disseminazione di batteri orali nel circolo ematico, l'aspirazione nel tratto respiratorio e l'aumento di biomarcatori associati a uno stato di infiammazione cronica e sistemica di basso grado (LGSI).[112]

1.4. L'oral-gut axis

Evidenze recenti suggeriscono che la parodontite possa potenzialmente influenzare la salute intestinale e sistemica attraverso la migrazione enterale e la colonizzazione ectopica di batteri orali autoctoni, configurando il razionale biologico del cosiddetto "asse oro-intestinale" (*oral-gut* o *gum–gut axis*).[113–115]

1.4.1. Vie di traslocazione e colonizzazione intestinale dei batteri orali

Kitamoto *et al.* hanno pubblicato una revisione sul *Journal of Dental Research* (JDR), nella quale vengono descritte due principali pathways proposte per la traslocazione dei batteri orali verso l'intestino: la via ematogena e quella enterale.[116]

Via ematogena

Le evidenze suggeriscono che attività quotidiane, quali masticazione e spazzolamento, nonché interventi clinici - tra cui detartrasi e strumentazione sottogengivale, trattamenti ortodontici ed estrazioni dentarie - possano indurre microtraumi, facilitando la disseminazione di batteri orali nel circolo ematico, fenomeno noto come batteriemia odontogena.[117,118] Inoltre, numerosi studi indicano che i soggetti affetti da patologie quali la parodontite presentano livelli aumentati di batteri orali nel circolo sistemico.[119] Ciò è principalmente attribuibile alla proliferazione di batteri patogeni orali nel cavo orale affetto e all'ulcerazione dell'epitelio delle tasche parodontali conseguente al processo infiammatorio.

Via enterale

Un'ulteriore possibile via di diffusione dei batteri orali è rappresentata dalla trasmissione enterale. In media, l'uomo deglutisce circa 1,5 litri di saliva al giorno, contenente una ricca e diversificata comunità di batteri orali residenti.[120]

Nonostante la loro continua ingestione, i batteri orali raramente riescono a traslocare e a colonizzare in modo ectopico un intestino sano. In altri termini, le evidenze suggeriscono che, nei soggetti sani, il cavo orale e l'intestino ospitano comunità microbiche nettamente distinte.[121,122] Questa segregazione è principalmente garantita dalla presenza di due barriere chiave che i batteri incontrano durante il loro transito:

- Acidità gastrica: numerosi batteri orali residenti risultano altamente sensibili all'acido cloridrico (HCl) gastrico. Pertanto, condizioni di ipocloridria possono favorire la traslocazione enterale dei microrganismi orali. Tale condizione può derivare da diversi fattori, tra cui gastrite cronica o autoimmune associata ad anemia perniciosa o infezione da *Helicobacter pylori*, uso prolungato di farmaci antiacidi, carcinoma gastrico e interventi chirurgici gastrici. Inoltre, alcune specie batteriche orali, inclusa *Porphyromonas gingivalis*, sembrano essere in grado di resistere all'ambiente acido dello stomaco.[116,123]
- Resistenza del microbiota intestinale: rappresenta il principale meccanismo di difesa contro la colonizzazione ectopica dell'intestino da parte dei batteri orali ingeriti. Attraverso meccanismi competitivi, i simbionti commensali intestinali ostacolano efficacemente l'insediamento di microrganismi provenienti da altri distretti anatomici. Di conseguenza, una condizione di disbiosi intestinale - derivante dall'uso di antibiotici, patologie intestinali, dieta squilibrata, fumo e altri fattori - può favorire un aumento della presenza di batteri orali nell'intestino.[116]

Ad oggi, il concetto di una netta separazione tra ambiente orale e intestinale è stato messo in discussione alla luce di evidenze che dimostrano come, anche nei soggetti sani, basse quantità di microrganismi orali siano costantemente rilevabili nei campioni fecali.[113] Schmidt *et al.*, mediante l'analisi di campioni salivari e fecali provenienti da 470 soggetti, sani e affetti da patologie, hanno dimostrato che circa un terzo delle specie batteriche intestinali deriva dalla cavità orale o è costituito da ceppi adattati all'ambiente intestinale delle stesse specie orali. Tuttavia, i pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD), carcinoma del colon-retto (CRC) e artrite reumatoide (RA) presentavano un tasso significativamente più elevato di trasmissione microbica orale-intestinale rispetto ai soggetti sani.[124]

1.4.2. Parodontite e disbiosi intestinale

Sebbene le evidenze sul rapporto tra parodontite e disbiosi intestinale siano ancora limitate, è verosimile che la proliferazione di specifici batteri orali in un ambiente orale patologico possa aumentare il trasferimento di tali microrganismi al tratto gastrointestinale, sia attraverso la via ematogena sia mediante quella enterale. Studi trasversali condotti nell'uomo hanno inoltre evidenziato una possibile associazione tra parodontite e un'aumentata presenza di batteri orali a livello intestinale, unitamente a una riduzione della β-diversità.[125]

Lourenço *et al.* hanno condotto uno studio esplorativo caso-controllo con l'obiettivo di confrontare il microbioma intestinale di soggetti affetti da parodontite, gengivite e controlli parodontalmente sani. Lo studio, svolto in ambito universitario, ha previsto la raccolta di campioni fecali, successivamente analizzati mediante sequenziamento del gene 16S rRNA tramite piattaforma Illumina MiSeq. I risultati hanno mostrato, nei pazienti con parodontite, un aumento dei phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* ed *Euryarchaeota*, accompagnato da una riduzione di *Bacteroidetes* rispetto ai soggetti sani.[126]

Nel 2022, Bao *et al.* hanno condotto uno studio in cui sono stati analizzati campioni fecali e salivari di soggetti parodontalmente sani e pazienti con parodontite severa, mediante sequenziamento del gene 16S rRNA. I risultati hanno evidenziato differenze significative nella composizione del microbiota fecale e salivare tra i due gruppi. In particolare, i microrganismi di origine salivare rappresentavano circa lo 0,6% del microbiota intestinale nei soggetti sani, mentre tale percentuale aumentava fino al 5,88% nei pazienti con parodontite, supportando l'ipotesi che i microrganismi orali associati alla parodontite possano contribuire alla disbiosi intestinale attraverso il loro ingresso nel tratto gastrointestinale.[127]

Un recente studio di Baima *et al.*, pubblicato sul *Journal of Dental Research* (JDR), ha analizzato il microbiota intestinale di pazienti con parodontite di stadio III e IV mediante sequenziamento del gene del 16S rRNA. I risultati hanno evidenziato un profilo microbico intestinale distintivo, capace di discriminare i pazienti con parodontite dai soggetti parodontalmente sani. In una coorte di 47 pazienti e 47 controlli sani, la β-diversità risultava significativamente più elevata nei campioni fecali del gruppo parodontite. Inoltre, numerosi generi batterici — tra cui *Bacteroidetes*, *Butyricicoccus*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Lachnoclostridium*, *Lachnospira*, *Lachnospiraceae*, *Oscillibacter*, *Oscillospiraceae* e *Roseburia* — risultavano maggiormente rappresentati nei pazienti con parodontite, mentre i soggetti sani mostravano una maggiore abbondanza di *Lactobacillus* spp. Tuttavia, dopo le fasi I e II della terapia parodontale, l'abbondanza di molti di questi generi si

riduceva significativamente, fino a raggiungere livelli sovrapponibili a quelli dei controlli sani.[125]

1.4.3. L'*oral-gut axis* nei modelli preclinici

Come precedentemente descritto, la parodontite può influenzare lo stato di salute intestinale attraverso la traslocazione dei batteri lungo l'asse cefalo-caudale del sistema digerente e l'attivazione di risposte immuno-infiammatorie a livello intestinale.

Le evidenze precliniche relative alla traslocazione di batteri di origine orale risultano ancora limitate. Bolei *et al.* hanno sviluppato un modello murino associato al microbiota orale umano, introducendo saliva umana in topi *germ-free* (GF). I risultati hanno dimostrato che i batteri orali sono in grado di colonizzare l'intestino tenue, dove circa il 40% dei taxa microbici derivava da comunità orali, con un aumento significativo dell'abbondanza relativa di *Streptococcus* e *Enterobacteriaceae* spp. Analogamente, Seedorf et al. hanno evidenziato che specie batteriche di origine orale, tra cui *Actinobacteria*, *Clostridium* e *Fusobacterium* spp., sono in grado di superare le barriere dell'ospite e persistere nel tratto intestinale distale di topi *germ-free*.[128,129]

Inoltre, i batteri di origine orale possono potenzialmente attivare risposte immunitarie dannose attraverso diversi meccanismi. Kitamoto et al. hanno dimostrato *in vivo* che l'infiammazione parodontale può esacerbare l'infiammazione intestinale utilizzando un modello di parodontite indotta da legatura. In particolare, i topi sottoposti a legatura mostravano un'infiammazione della mucosa colica più severa rispetto ai controlli. Parallelamente, la parodontite promuoveva l'espansione di cellule Th17 reattive ai patobionti orali all'interno del cavo orale. Queste cellule acquisivano proprietà di *gut-homing* e infiltravano la lamina propria dell'intestino infiammato. Una volta localizzate in questo compartimento, venivano riattivate dai patobionti orali traslocati, ma non dai microrganismi commensali intestinali. Inoltre, lo studio ha evidenziato che *Klebsiella* spp. ed *Enterobacter* spp., nei topi con parodontite indotta da legatura, colonizzavano ectopicamente l'intestino, dove attivavano l'inflammasoma nei fagociti mononucleati della mucosa colica, innescando così l'infiammazione intestinale. Tuttavia, tale fenomeno è stato osservato esclusivamente nei topi con colite sperimentale indotta mediante trattamento con destrano solfato di sodio (DSS). Questi risultati suggeriscono che un microbiota intestinale sano eserciti una resistenza alla colonizzazione nei confronti di tale insediamento ectopico. Al contrario, uno stato di infiammazione intestinale sembra compromettere questa resistenza, facilitando la traslocazione dei patobionti orali a livello intestinale.[130] Un ulteriore studio *in vivo* di Atarashi *et al.* ha evidenziato come i microrganismi del cavo orale possano attivare in modo aberrante il sistema immunitario, inducendo uno stato

di infiammazione cronica locale. In particolare, mediante somministrazione orale (*gavage*) di campioni salivari provenienti da soggetti con insufficienza renale cronica (CRF) in topi *germ-free* (GF), è stata osservata un'espansione patogena di linfociti Th1 ($CD4^+$; $IFN\gamma^+$) nella lamina propria intestinale, principalmente mediata da *Klebsiella* spp.[131]

1.4.4. L'*oral-gut axis* nell'uomo

Nell'uomo, in condizioni fisiologiche, alcune specie microbiche sono presenti sia nella cavità orale sia nel tratto gastrointestinale. Ad esempio, batteri appartenenti al genere *Prevotella*, comunemente riscontrati nella saliva, sono frequentemente rilevati anche nei campioni fecali.[132]

Tuttavia, le evidenze nell'uomo relative alla presenza e alla traslocazione specifica di batteri orali a livello intestinale risultano ancora estremamente limitate. Ciò è in larga parte attribuibile alla ridotta risoluzione delle tecniche di sequenziamento impiegate nella maggior parte degli studi disponibili. Inoltre, sebbene la rilevazione di batteri orali nel microbioma intestinale possa suggerire una potenziale traslocazione, tale osservazione non è di per sé conclusiva. L'interpretazione errata di artefatti come segnali microbici autentici può infatti portare all'identificazione erronea degli stessi taxa batterici in diversi distretti anatomici o condizioni sperimentali. Un esempio ampiamente riconosciuto di tali artefatti è il cosiddetto "*kitome*" (kitoma), che si riferisce a DNA batterico contaminante introdotto durante le fasi di estrazione o attraverso i reagenti di sequenziamento. In assenza di adeguati controlli negativi, tali contaminanti possono essere erroneamente interpretati come reali componenti del campione, determinando la falsa identificazione degli stessi taxa batterici in campioni differenti.[133]

In sostanza, per poter affermare che specie batteriche rilevate a livello intestinale derivino dalla cavità orale, è necessario ricorrere a tecniche di sequenziamento dell'intero genoma ad alta risoluzione, capaci di operare a livello di ceppo (*strain-level*). Ciò in quanto l'identificazione dei batteri al solo livello di specie può risultare fuorviante: membri appartenenti alla stessa specie possono differire in modo significativo per assetto genetico, potenziale funzionale e comportamento ecologico. Gli approcci volti a tracciare l'origine delle popolazioni microbiche includono l'identificazione di varianti a singolo nucleotide (SNV), firme CRISPR, marcatori genetici ceppo-specifici o genomi completamente ricostruiti.[133]

I recenti progressi nelle tecnologie di sequenziamento hanno migliorato significativamente la nostra comprensione delle comunità microbiche presenti nei diversi distretti del corpo umano.[134,135] Questi progressi hanno promosso lo sviluppo della biologia dei sistemi,

orientando progressivamente la ricerca verso il campo delle "*omics*". Le tecnologie omiche, come la *strain-resolved metagenomics*, in combinazione con approcci di bioinformatica e biostatistica, consentono l'identificazione e la quantificazione ad alta risoluzione di numerosi parametri biologici, inclusa la caratterizzazione di specie precedentemente non identificate. Tale approccio permette di ottenere una visione più accurata delle variazioni tra genotipo e fenotipo.[136,137]

2. Obiettivo

Alla luce di questo background scientifico, risulta evidente la necessità di una più approfondita caratterizzazione funzionale e tassonomica dei microbiomi orale e intestinale, unitamente a una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici che collegano parodontite, disbiosi intestinale e patologie gastrointestinali. Tali conoscenze potrebbero inoltre rappresentare la base per future applicazioni nell'ambito della medicina di precisione.

In questo contesto, il presente studio clinico è stato progettato con l'obiettivo di investigare e confrontare firme microbiche distintive in diversi campioni biologici (placca, saliva e feci) mediante un approccio metagenomico. In particolare, lo studio si propone di caratterizzare l'asse orale-intestino in pazienti con differenti condizioni parodontali, dalla salute clinica fino alla parodontite severa (stadio III generalizzato e stadio IV).

3. Materiali e Metodi

Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico istituzionale locale (protocollo n. 345/2023) e il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i partecipanti prima della loro inclusione nello studio. Inoltre, lo studio è stato registrato prospetticamente su ClinicalTrials.gov prima del suo avvio (NCT04826926).

3.1. Popolazione di studio

La coorte dello studio è stata selezionata tra i soggetti afferenti per visite odontoiatriche presso il C.I.R. Dental School dell'Università di Torino (Italia), nel periodo compreso tra settembre 2023 e luglio 2024. Volontari parodontalmente sani, appaiati per età e sesso, sono stati arruolati come gruppo di controllo.

La diagnosi parodontale è stata stabilita in accordo con il sistema di classificazione delineato congiuntamente dalla *European Federation of Periodontology* (EFP) e dall'*American Academy of Periodontology* (AAP).[103] I partecipanti inclusi nel gruppo caso erano affetti da parodontite generalizzata di stadio III o IV. I controlli, appaiati per età e sesso, sono stati definiti sulla base dei seguenti criteri: assenza di anamnesi positiva per parodontite, assenza di perdita di attacco clinico interdentale (CAL) e assenza di perdita dentaria correlata alla parodontite. I pazienti affetti da gengivite, sia localizzata sia generalizzata, sono stati inclusi nel gruppo di controllo, mentre i soggetti con parodontite di stadio I o II sono stati esclusi.

I criteri di inclusione per il gruppo caso comprendevano: consenso informato ottenuto prima dell'inizio dello studio e diagnosi di parodontite generalizzata di stadio III o IV. I criteri di esclusione includevano: presenza di patologie sistemiche, tra cui diabete mellito e disturbi gastrointestinali; assunzione di farmaci noti per influenzare lo stato parodontale (ad esempio calcio-antagonisti, farmaci antiepilettici, ciclosporina o contraccettivi orali combinati estrogeno-progestinici ad alto dosaggio); indice di massa corporea (BMI) $<18,5$ o ≥ 30 kg/m^2; gravidanza o allattamento; allergie alimentari; trattamento parodontale nei 12 mesi precedenti. Inoltre, i soggetti con parodontite che avevano assunto antibiotici sistemici tra il baseline e il follow-up a tre mesi sono stati esclusi.

I criteri di eleggibilità per l'inclusione nel gruppo di controllo comprendevano: assenza di siti con perdita di attacco clinico interdentale (CAL) >1 mm in almeno due denti non adiacenti

e assenza di profondità di sondaggio (PPD) ≥6 mm. Valori di PPD compresi tra 4 e 5 mm, attribuibili a pseudo-tasche o edema gengivale, non sono stati considerati criteri di esclusione.

3.2. Procedure cliniche

I partecipanti selezionati sono stati sottoposti a un esame parodontale completo a bocca intera mediante sonda parodontale PCP UNC-15 (*Hu-Friedy*, *Chicago*, IL, USA), eseguito da due esaminatori esperti e calibrati affiliati all'EFP. L'indice di placca (PI), il sanguinamento al sondaggio (BoP), la profondità di sondaggio (PPD) e la perdita di attacco clinico (CAL) sono stati registrati in sei siti per dente. L'affidabilità inter-esaminatore è stata valutata mediante doppie misurazioni su 15 soggetti non inclusi nello studio, confrontate con quelle di un terzo esaminatore di riferimento, mentre la riproducibilità intra-esaminatore è stata determinata tramite misurazioni replicate sugli stessi soggetti a distanza di 24 ore. La percentuale di concordanza entro 1 mm per PPD e CAL risultava compresa tra il 94% e il 97%. I pazienti con segni clinici e radiografici di parodontite sono stati quindi sottoposti agli algoritmi di stadiazione e grading secondo i criteri diagnostici parodontali.[103]

Ai pazienti arruolati è stato assegnato un codice identificativo univoco di studio (SPIC), contrassegnato con "P" per i casi e "C" per i controlli, utilizzato per identificare tutti i dati e i campioni biologici successivi. Tali codici sono stati registrati in un registro pazienti confidenziale e archiviati su un server istituzionale ad accesso limitato. A seguito dell'anonimizzazione, i dati demografici, biochimici e clinici di ciascun partecipante sono stati raccolti in un database separato e indipendente.

3.3. Raccolta, processamento e conservazione dei campioni biologici

Entro 7 giorni dall'esame odontoiatrico, sono stati raccolti campioni di placca sottogengivale, saliva e feci, successivamente processati e conservati in condizioni appropriate fino all'analisi. Prima della raccolta, ai partecipanti è stato richiesto di astenersi dal consumo di alcol per almeno 12 ore e di evitare l'assunzione di cibo, bevande zuccherate o caffeina nella mattina del prelievo. Inoltre, ai partecipanti è stato richiesto di non utilizzare dentifrici e collutori durante l'igiene orale domiciliare, al fine di evitare alterazioni nella composizione della saliva e della placca dentale.[138]

La placca batterica sottogengivale è stata prelevata dal sito più profondo di ciascun quadrante del paziente (sito test) e da un sito controlaterale con PPD ≤3 mm e assenza di sanguinamento al sondaggio (BoP). Prima del campionamento, il sito è stato accuratamente asciugato e l'eventuale placca sopragengivale è stata rimossa. In presenza di lieve sanguinamento, l'area è

stata detersa prima del prelievo, mentre in caso di sanguinamento abbondante il campione è stato raccolto da un sito alternativo con PPD comparabile. La placca sottogengivale è stata quindi raccolta mediante curette Gracey sterili e trasferita in una provetta contenente tampone DNA/RNA Shield™ (*Zymo Research*, *Irvine*, CA, USA). La procedura è stata ripetuta due volte nello stesso sito. Infine, la provetta è stata agitata per 10 secondi e conservata a temperatura ambiente.

Sono stati raccolti 4 mL di saliva intera non stimolata *chair-side* tra le 08:00 e le 10:00, al fine di ridurre la variabilità legata a stimoli esterni e alle fluttuazioni ormonali circadiane. Ciascun campione è stato raccolto direttamente in una provetta sterile contenente tampone DNA/RNA Shield™ (*Zymo Research*, *Irvine*, CA, USA).

A tutti i partecipanti è stato richiesto di fornire un campione fecale. La raccolta è stata effettuata autonomamente a domicilio da ciascun volontario, utilizzando un cucchiaino in polipropilene per trasferire tre aliquote (circa 10 g) in una provetta sterile per la raccolta fecale contenente tampone DNA/RNA Shield™ (*Zymo Research*, *Irvine*, CA, USA).

Tutti i campioni sono stati trasferiti il giorno stesso della raccolta al Laboratorio di Epatologia Molecolare e Gastroenterologia (Università di Torino, Italia), dove sono stati immediatamente congelati a −80 °C. Successivamente, i campioni congelati sono stati spediti su ghiaccio secco al Metagenomics Lab CIBIO (Università di Trento, Italia) per le successive analisi.

3.4. Procedure pre-analitiche

Il DNA proveniente dai campioni è stato estratto utilizzando il kit DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN, *Hilden*, Germania). Gli acidi nucleici sono stati successivamente processati per la preparazione delle librerie e il sequenziamento con l'impiego della piattaforma NovaSeq 6000 (*Illumina Inc.*, *San Diego*, CA, USA).

3.5. Analisi metagenomiche

I campioni di placca, saliva e feci sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma mediante approccio metagenomico shotgun. Ogni campione è stato sequenziato con una profondità di lettura superiore a 15 GB.

Le analisi del microbioma sono state precedute da una fase di *subsampling* delle reads di sequenziamento, finalizzata a normalizzare le differenze nella profondità di sequenziamento tra i campioni (5 milioni per i campioni orali e 50 milioni per i campioni fecali). Questo approccio

di rarefazione consente di evitare bias nelle metriche di diversità a valle dovuti a variazioni tecniche nel numero di reads e permette un confronto equo tra campioni caratterizzati da differenti livelli di copertura di sequenziamento.

Le analisi sono state eseguite utilizzando MetaPhlAn4 (v4.1.0), basato sul database ChocoPhlAn per la classificazione tassonomica. A seguito del preprocessing, per ciascun campione è stata generata una tabella di abbondanza tassonomica. Successivamente, è stata condotta un'analisi di abbondanza differenziale mediante LEfSe (v1.1.2), al fine di identificare i taxa microbici significativamente associati alle condizioni cliniche. Tale approccio consente di individuare potenziali biomarcatori microbici in grado di discriminare tra individui affetti e non affetti, controllando il tasso di falsi positivi e tenendo conto della natura composizionale dei dati del microbioma.

3.6. Analisi statistiche

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando Python (v3.12.10), avvalendosi delle seguenti librerie: pandas (v2.2.3), numpy (v2.2.5), scikit-learn (v1.7.0), statsmodels (v0.14.4) e seaborn (v0.13.2).

3.6.1. Statistica descrittiva

Sono state calcolate statistiche descrittive per sintetizzare le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in studio. Le variabili continue, quali età e indice di massa corporea (BMI), sono state riportate come media ± deviazione standard, mentre le variabili categoriali sono state espresse come frequenze assolute e percentuali.

3.6.2. Comparazione tra i gruppi

Al fine di valutare eventuali differenze tra individui affetti e non affetti dalla condizione, sono stati applicati appropriati test statistici.

Sono stati eseguiti *t*-test per campioni indipendenti per confrontare le variabili continue tra i due gruppi. L'analisi non ha evidenziato differenze significative nell'età tra i gruppi ($t = 1{,}43$; $p = 0{,}1566$). Al contrario, è stata osservata una differenza significativa nell'indice di massa corporea (BMI) ($t = 2{,}53$; $p = 0{,}0134$), indicando che, mentre l'età risultava comparabile tra i gruppi, il BMI differiva in modo significativo.

Sono stati eseguiti test del *chi-square* (χ^2) per valutare l'associazione tra variabili categoriali e la condizione. È stata riscontrata un'associazione significativa tra il sesso e la condizione (χ^2

= 4,80; p = 0,0284), nonché tra lo stato di fumo e la condizione (χ^2 = 8,83; p = 0,0121). Al contrario, l'associazione tra diabete e la condizione non è risultata statisticamente significativa (χ^2 = 2,50; p = 0,1138). Sebbene siano emerse associazioni nelle variabili categoriali, alcuni pattern borderline (ad esempio il sesso) potrebbero richiedere ulteriori analisi mediante modelli aggiustati.

3.6.3. Regressione logistica

È stato applicato un modello di regressione logistica multivariata per stimare l'associazione tra la presenza della condizione patologica (parodontite; variabile dipendente) e diversi predittori indipendenti. Tra questi erano inclusi età (variabile continua), indice di massa corporea (BMI), sesso (variabile categoriale: maschio/femmina) e stato di fumo (variabile categoriale: fumatore attuale, ex fumatore o non fumatore). Il modello ha consentito un aggiustamento simultaneo per tutte le variabili considerate, permettendo di valutare il contributo indipendente di ciascun fattore sulle probabilità di insorgenza della malattia.

4. Risultati

Un totale di 39 pazienti con parodontite di stadio III/IV e 23 volontari parodontalmente sani sono stati inizialmente reclutati per l'esame parodontale. Tuttavia, due partecipanti sono stati esclusi dallo studio a seguito del ritiro del consenso e del rifiuto di proseguire.

4.1. Caratteristiche della popolazione e regressione logistica

Le caratteristiche della popolazione in studio sono riportate nella Tabella 1. La maggior parte della coorte era costituita da donne (58,1%), con una proporzione del 51,3% nel gruppo con parodontite e del 69,6% nel gruppo di controllo. L'età media era pari a 55,6 ± 13,3 anni nel gruppo con parodontite e a 49,4 ± 9,3 anni nel gruppo di controllo. Inoltre, la maggior parte dei partecipanti apparteneva all'etnia caucasica (n = 55; rispettivamente 89,7% e 87,0%). Infine, i gruppi risultavano comparabili per quanto riguarda lo stato di fumo, il consumo di alcol e le condizioni di salute sistemica.

Tabella 1. Caratteristiche sociodemografiche della popolazione di studio

Parameter	**Periodontitis** (n=39)	**Healthy** (n=23)	**Total** (n=62)
Age, mean (SD), y	55.6 (13.3)	49.4 (9.3)	53.3 (12.3)
Gender, *n* (%)			
Females	20 (51.3)	16 (69.6)	36 (58.1)
Males	19 (48.7)	7 (30.4)	26 (41.9)
Ethnicity, *n* (%)			
Caucasian	35 (89.7)	20 (87.0)	55 (88.7)
Black	2 (5.1)	1 (4.3)	3 (4.8)
Asian	1 (2.6)	—	1 (1.6)
Hispanic	1 (2.6)	1 (4.3)	2 (3.2)
Other	—	1 (4.3)	1 (1.6)
Smoking, *n* (%)			
Nonsmokers	22 (56.4)	14 (93.3)	36 (66.7)
Former smokers	11 (28.2)	—	11 (20.4)
Smokers	6 (15.4)	1 (6.7)	7 (13.0)
BMI, mean (SD), kg/m²	25.7 (3.2)	22.0 (2.5)	24.4 (3.4)

BMI = *body mass index*

I risultati dell'analisi di regressione logistica multivariata sono riportati nella Tabella 2. Nel complesso, il BMI e il comportamento tabagico sono emersi come i principali predittori del modello. Il BMI risultava significativamente associato a una maggiore probabilità di parodontite (p = 0,016). Analogamente, lo stato di fumo ha mostrato un effetto significativo: i soggetti non fumatori presentavano una probabilità significativamente inferiore di malattia

rispetto ai fumatori attuali (p = 0,040), mentre gli ex fumatori mostravano una probabilità sovrapponibile a quella dei non fumatori (p = 0,790). Al contrario, l'età (p = 0,758) e il sesso maschile (p = 0,075) non risultavano significativamente associati alla presenza della malattia. La variabile diabete è stata esclusa dal modello finale a causa di separazione perfetta, in quanto tutti i pazienti diabetici presentavano parodontite. Tale assenza di variabilità dell'outcome rispetto allo stato diabetico impedisce una stima affidabile del suo effetto nel modello di regressione logistica. Pertanto, sebbene il diabete possa rappresentare un fattore clinicamente rilevante, la sua inclusione statistica non è risultata possibile nel presente dataset.

Tabella 2. Regressione logistica multipla dei perdittori associate alla malattia

Variable	Coef.	Std. Err	z-score	p-value	95% CI
Intercept	-3.78	2.03	-1.86	0.062	[-7.76, 0.19]
BMI	0.186	0.078	2.40	0.016	[0.034, 0.338]
Age	0.0057	0.018	0.31	0.758	[-0.030, 0.042]
Sex (Male)	0.964	0.541	1.78	0.075	[-0.097, 2.025]
Smokers (Never)	-1.628	0.794	-2.05	0.040	[-3.183, -0.072]
Smokers (Past)	0.355	1.330	0.27	0.790	[-2.252, 2.961]

Tutti i pazienti affetti da malattia sono stati diagnosticati con parodontite severa, con il 64,10% classificato come stadio III generalizzato e il 35,90% come stadio IV. Nel gruppo di controllo, il 47,83% dei partecipanti presentava gengivite, di cui il 45,45% in forma localizzata e il 54,55% in forma generalizzata. Come atteso, il gruppo con parodontite ha mostrato livelli significativamente più elevati di FMBS, FMPS e del numero medio di siti con PPD. Inoltre, presentava una maggiore proporzione di siti con PPD >4 mm associati a sanguinamento al sondaggio (BoP+), nonché una percentuale più elevata di siti con PPD >6–7 mm. Al contrario, il gruppo di controllo evidenziava un numero significativamente maggiore di siti con PPD <3 mm (Figura 1*Radar plots*).

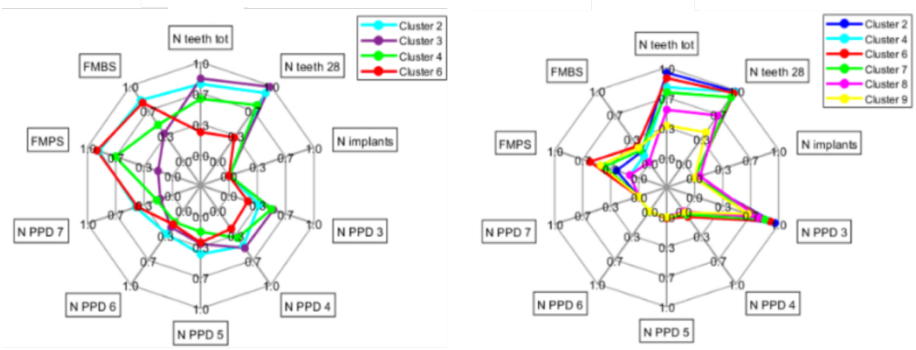


Figura 1. Radar plots che illustrano le caratteristiche parodontali descrittive della popolazione in studio (pazienti affetti da parodontite a sinistra e controlli sani a destra)

4.2. Differenze nel profilo tassonomico globale

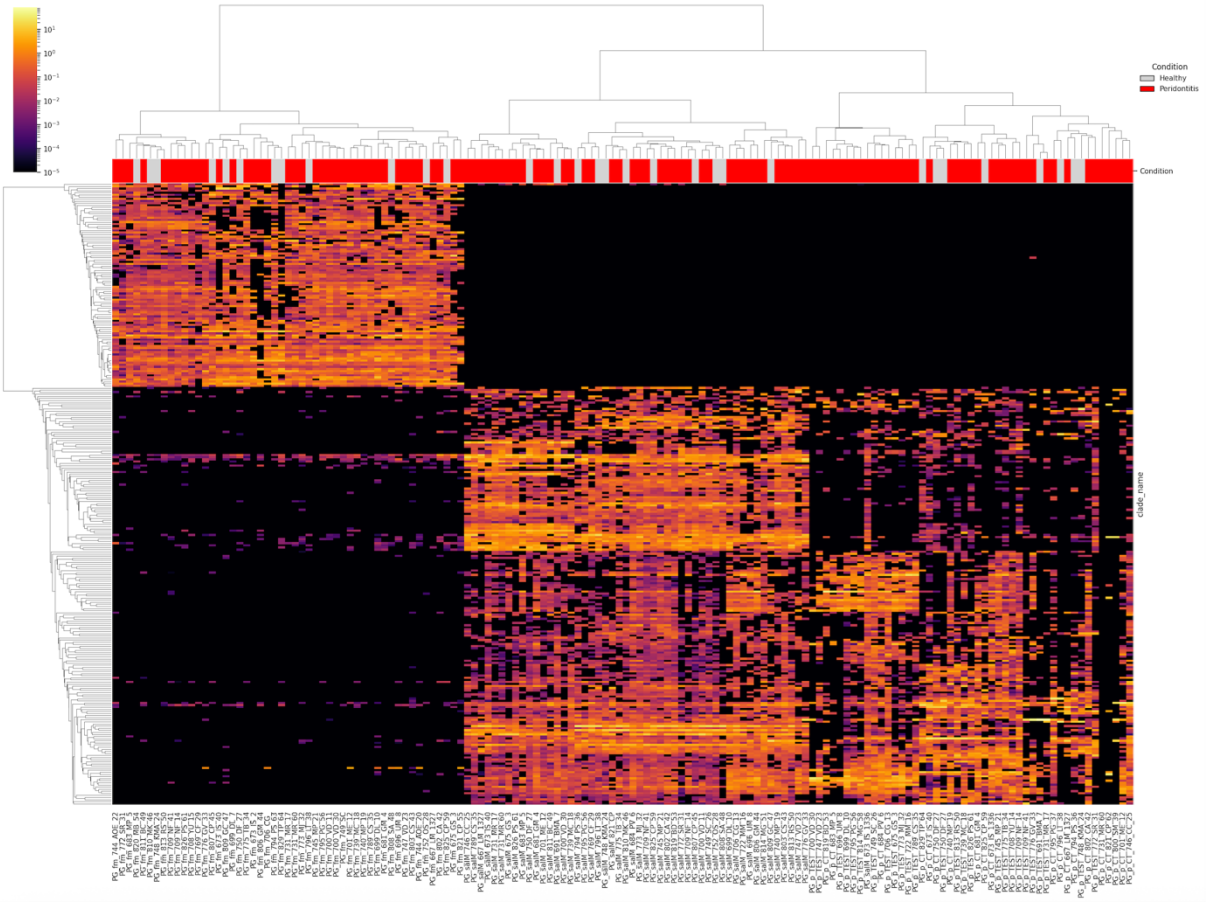


Figura 2. Clustermap (heatmap) che mostra il raggruppamento gerarchico delle specie microbiche (asse Y) e dei campioni (asse X). I campioni fecali sono raggruppati a sinistra, quelli salivari al centro e quelli di placca sottogengivale a destra.

È emersa una netta separazione tra i microbiomi intestinale e orale. I campioni fecali mostravano una composizione microbica distinta, marcatamente divergente rispetto a quella dell'ambiente orale. Al contrario, i campioni di saliva e placca presentavano un elevato grado di somiglianza tra loro, coerentemente con la loro comune nicchia ecologica all'interno della cavità orale. Tuttavia, nonostante questa evidente segregazione, è stata comunque rilevata la presenza di specifici taxa di origine orale nei campioni fecali (Figura 2, *Clustermap*).

Nel confronto dei campioni di placca sottogengivale provenienti dai siti test, i soggetti con parodontite mostravano un aumento statisticamente significativo dell'α-diversità — valutata in termini di ricchezza e indice di Shannon — rispetto ai controlli sani ($p < 0,05$). Al contrario, per quanto riguarda i siti di controllo, non sono emerse differenze statisticamente significative nell'indice di Shannon tra pazienti con parodontite e soggetti sani ($p > 0,05$). In altri termini, nonostante lievi variazioni nei valori mediani e negli intervalli interquartili, la diversità microbica complessiva risultava sovrapponibile tra i due gruppi.

Non sono emerse differenze statisticamente significative nella ricchezza microbica né nell'indice di Shannon nei campioni di saliva e feci tra i soggetti con parodontite e i controlli sani ($p > 0,05$).

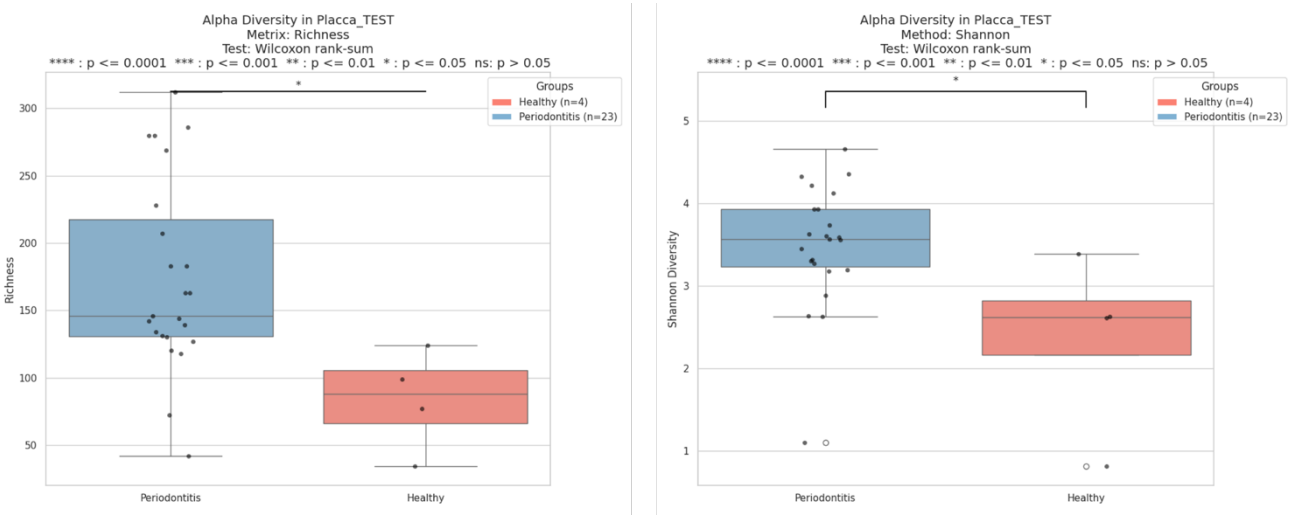


Figura 3. Box plots che illustrano la ricchezza delle specie microbiche (a sinistra) e la diversità secondo l'indice di Shannon (a destra) nei campioni di placca sottogengivale prelevati dai siti test, confrontando i soggetti sani con i pazienti affetti da parodontite.

4.3. Taxa differenzialmente abbondanti

Considerando sia la frequenza di rilevamento sia l'abbondanza relativa, diverse unità genomiche a livello di specie (*species-level genome bins*, SGBs) sono risultate significativamente arricchite ($p < 0,05$) nei campioni di placca dei siti test nel gruppo con parodontite, evidenziando una firma microbica distintiva associata allo stato di malattia a livello di specie. In particolare, i pazienti con parodontite mostravano un'aumentata abbondanza di *Treponema socranskii*, *Selenomonas* spp. (SGB5896), *Dialister pneumosintes* e *Prevotella jejuni*, oltre a una specie ancora non identificata (GGB4299-SGB5872). Al contrario, nei soggetti sani si osservava una maggiore prevalenza di taxa quali *Actinomyces oris*, *Neisseria bacilliformis*, *Capnocytophaga* spp. (SGB212222), *Streptococcus intermedius*, *Kingella bonacorsii* e *Arachnia propionica* (Figura 4).

Per quanto riguarda la placca sottogengivale dei siti di controllo, i pazienti con parodontite mostravano una sovra-rappresentazione di SGB appartenenti a diversi taxa, tra cui *Mogibacterium timidum* ($p < 0,01$), *Porphyromonas endodontalis*, *Alloprevotella tannerae*, *Eubacterium nodatum*, *Treponema socranskii*, *Peptostreptococcus stomatis* e *Phocaeicola abscessus*, oltre a un taxon ancora non classificato (GGB4333-SGB5935) ($p < 0,05$). Al contrario, nei soggetti sani si osservava una maggiore abbondanza e prevalenza di taxa quali *Arachnia rubra* ($p < 0,01$), *Lautropia dentalis*, *Corynebacterium durum*, *Actinomyces naeslundii*, *Cardiobacterium hominis*, *Capnocytophaga haemolytica*, *Streptococcus*

intermedius, *Kingella* spp. (SGB9425) e *Leptotrichia hongkongensis* ($p < 0,05$). Tali differenze sono risultate tutte statisticamente significative, come confermato dall'analisi della dimensione dell'effetto mediante Linear Discriminant Analysis (LDA) (Figura 5).

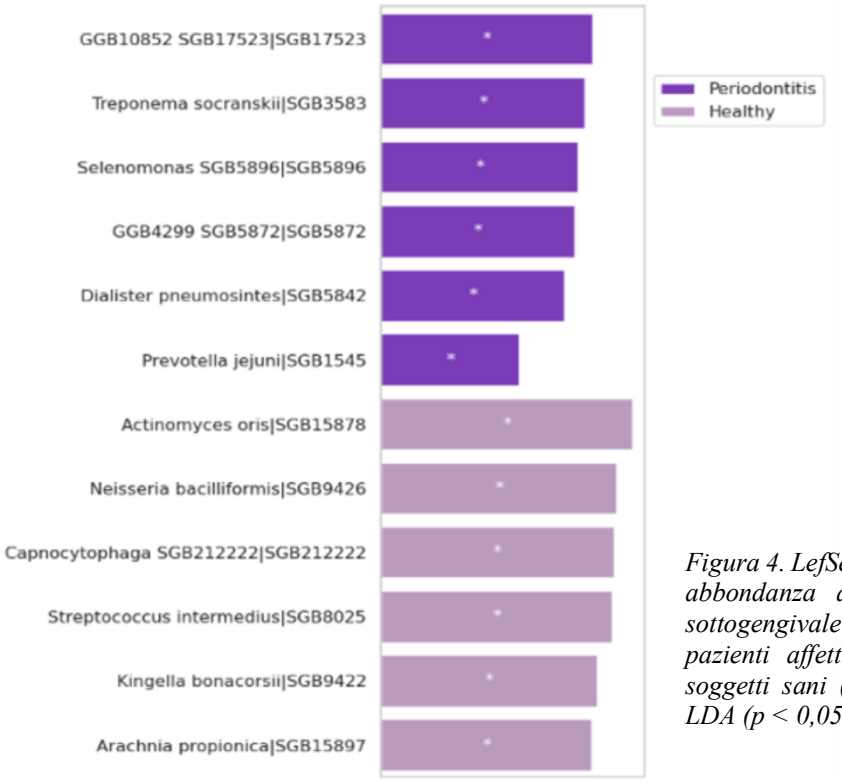


Figura 4. LefSe plots che mostrano i taxa microbici con abbondanza differenziale nei campioni di placca sottogengivale prelevati dai siti test, confrontando i pazienti affetti da parodontite (viola scuro) con i soggetti sani (viola chiaro), sulla base dei punteggi LDA ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

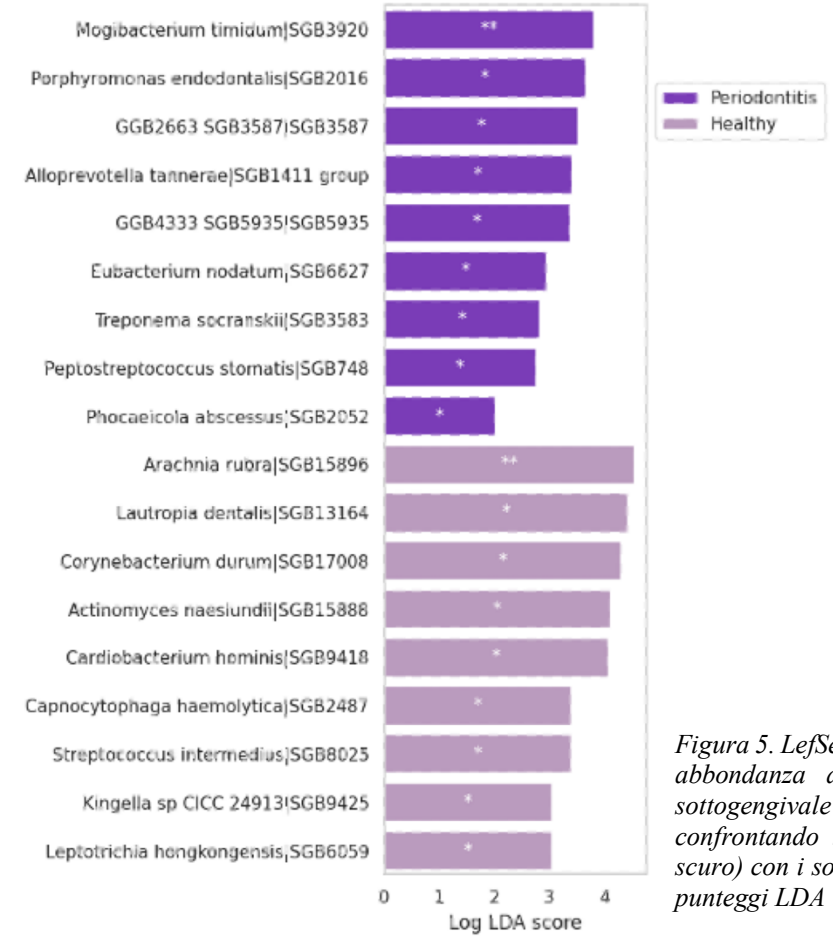


Figura 5. LefSe plots che mostrano i taxa microbici con abbondanza differenziale nei campioni di placca sottogengivale prelevati dai siti di controllo, confrontando i pazienti affetti da parodontite (viola scuro) con i soggetti sani (viola chiaro), sulla base dei punteggi LDA ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

Differenze rilevanti sono emerse anche nel microbioma salivare tra soggetti con parodontite e controlli sani. I profili salivari dei pazienti con parodontite risultavano caratterizzati da una maggiore abbondanza di diversi patobionti orali ben noti, tra cui *Porphyromonas gingivalis*, *Peptostreptococcus stomatis* ($p < 0,01$), *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*, *Filifactor alocis*, *Streptococcus cristatus* e *Treponema denticola*, oltre a una specie non ancora classificata (GGB4333-SGB5935) ($p < 0,05$). Al contrario, nei soggetti sani si osservava una maggiore abbondanza di *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus* spp. (SGB8067), *Kingella pumila* ($p < 0,01$), *Haemophilus sputorum*, *Hoylesella shahii*, *Lautropia dentalis*, *Schaalia* spp. (SGB61272), *Haemophilus pittmaniae* e un'ulteriore specie non caratterizzata (GGB4936-SGB6889) ($p < 0,05$). Tutte queste differenze sono risultate statisticamente significative (Figura 6).

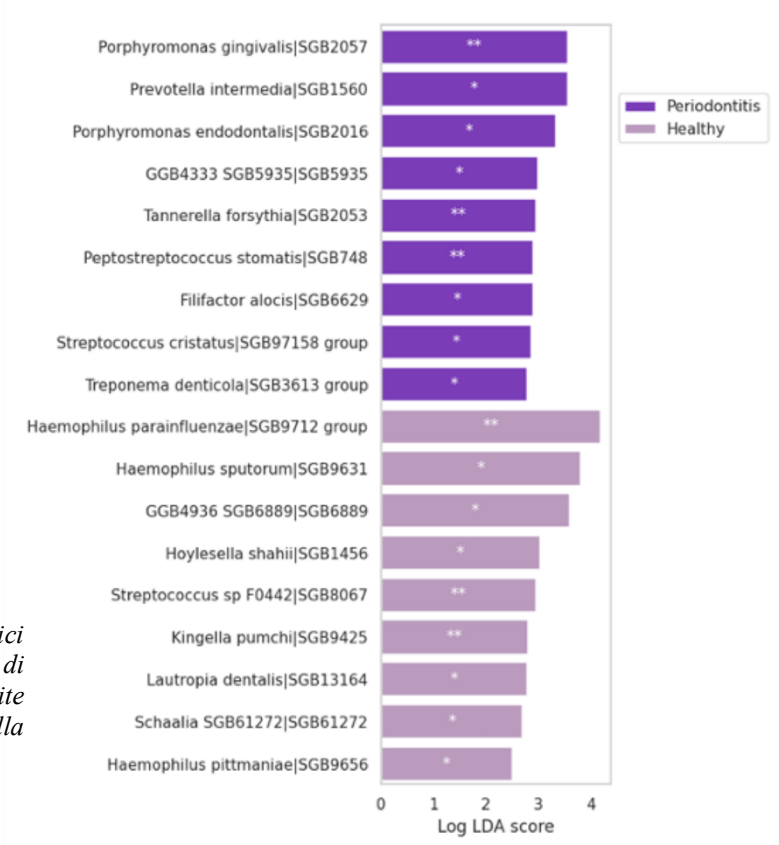


Figura 6. LefSe plots che mostrano i taxa microbici con abbondanza differenziale nei campioni di saliva, confrontando i pazienti affetti da parodontite (viola scuro) con i soggetti sani (viola chiaro), sulla base dei punteggi LDA ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

Infine, sono emerse differenze rilevanti anche nel microbioma intestinale tra soggetti con parodontite e controlli sani. I campioni fecali del gruppo con parodontite risultavano caratterizzati da una maggiore abbondanza di diversi taxa, tra cui *Holdemanella porci* ($p < 0,01$), *Phocaeicola plebeius*, *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Prevotella clara*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Faecalibacterium wellingii* ed *Ellagibacter isourolithinifaciens*, oltre a tre specie non ancora classificate (GGB9730-SGB15291, GGB9350-SGB14317,

GGB3730-SGB5060) ($p < 0,05$). Al contrario, nei soggetti sani si osservava un arricchimento di taxa quali *Bacteroides cellulosilyticus* ($p < 0,01$), *Phascolarctobacterium faecium*, *Anaerostipes hadrus*, *Parabacteroides distasonis*, *Bilophila wadsworthia*, *Streptococcus thermophilus*, *Coprobacter fastidiosus*, *Coprococcus eutactus*, *Faecalibacterium prausnitzii* e ulteriori taxa non ancora caratterizzati (GGB13727-SGB8655, GGB1689-SGB2321, GGB907-SGB13990) ($p < 0.05$) (Figura 7).

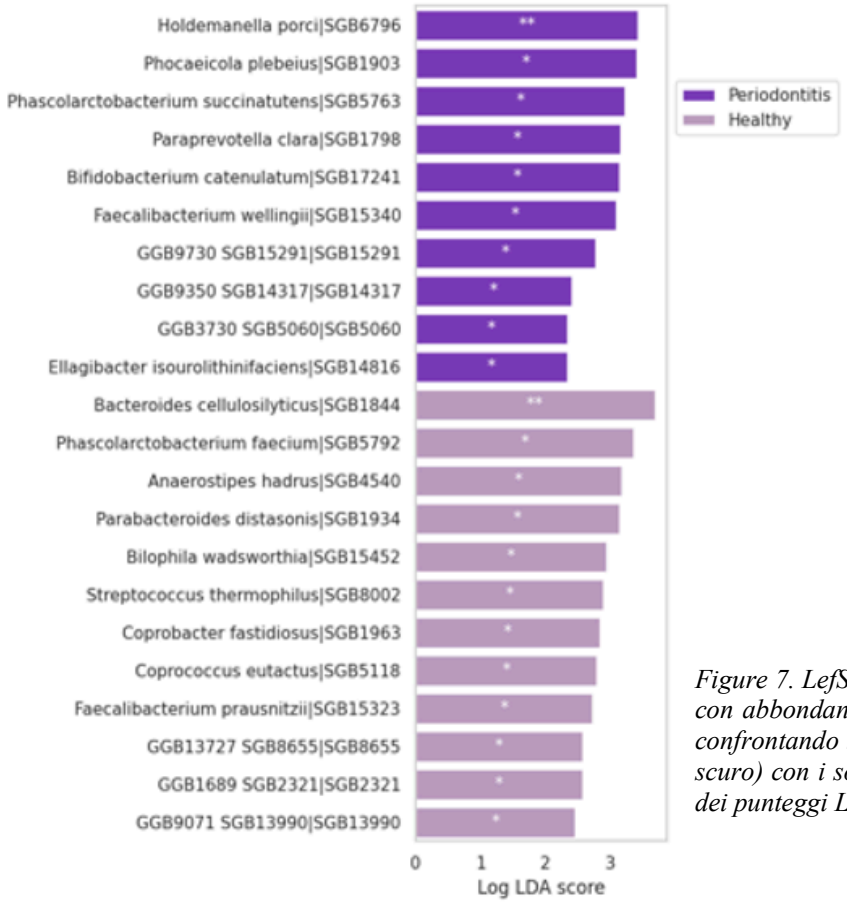


Figure 7. LefSe plots che mostrano i taxa microbici con abbondanza differenziale nei campioni di feci, confrontando i pazienti affetti da parodontite (viola scuro) con i soggetti sani (viola chiaro), sulla base dei punteggi LDA ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

4.4. Specie condivise tra cavità orale e intestino

Un'analisi comparativa dei microbiomi salivare e fecale ha evidenziato una significativa sovrapposizione di specie tra la cavità orale e l'intestino sia nei soggetti sani sia nei pazienti con parodontite. Tuttavia, la composizione e la frequenza di questi taxa condivisi variavano tra i due gruppi, suggerendo una possibile via di trasmissione microbica lungo l'asse orale-intestino associata allo stato di malattia. In particolare, nel gruppo con parodontite, tale asse risultava caratterizzato prevalentemente dalla presenza di simbionti e patobionti orali noti, tra cui *Streptococcus salivarius*, *Schaalia odontolytica*, *Saccharibacteria* TM7, *Dialister invisus* e *Veillonella parvula*. Al contrario, nei soggetti sani, le specie maggiormente condivise includevano *Streptococcus australis*, *S. salivarius*, *S. parasanguinis* e *Actinomyces oris*, microrganismi tipicamente associati al mantenimento dell'omeostasi orale.

Tuttavia, nonostante le differenze composizionali osservate, il numero complessivo di specie microbiche condivise tra cavità orale e intestino — considerato come proxy dell'introgressione di specie — non risultava significativamente diverso tra soggetti sani e pazienti con parodontite (Wilcoxon rank-sum test, $p = 0.767$) (Figura 8).

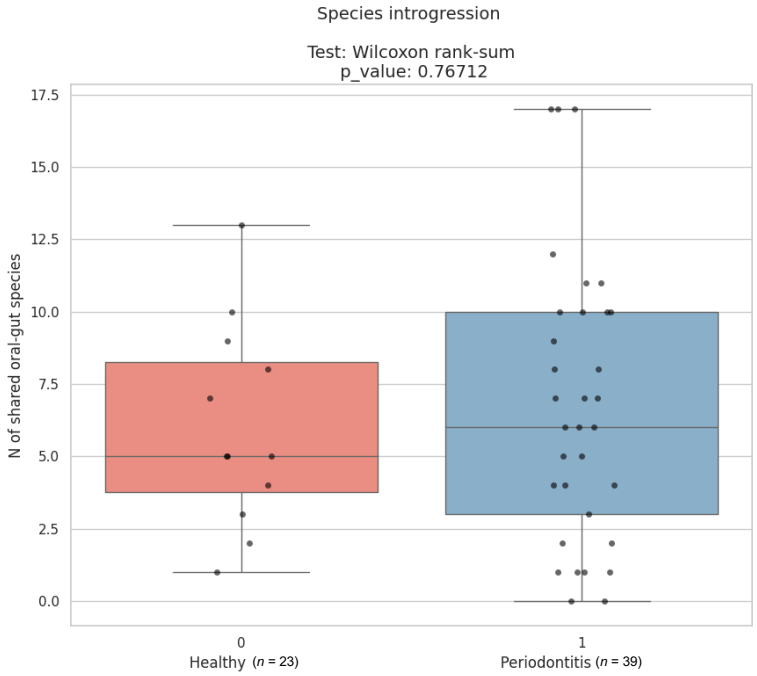


Figura 8. Box plots che illustrano la presenza di specie microbiche di origine orale nel microbiota intestinale, confrontando i soggetti sani con i pazienti affetti da parodontite.

5. Discussione

I risultati preliminari del presente studio confermano l'esistenza di una netta distinzione ecologica tra la cavità orale e il tratto intestinale. Le comunità microbiche fecali presentavano una composizione tassonomica chiaramente distinta rispetto ai siti orali, mentre saliva e placca sottogengivale mostravano un'elevata similarità, riflettendo la loro prossimità anatomica ed ecologica. Tuttavia, nonostante tale segregazione, un sottogruppo significativo di taxa orali — tra cui *Streptococcus anginosus*, *S. salivarius*, *Veillonella parvula* e *Dialister invisus* — è stato rilevato anche nei campioni fecali. L'elevata profondità del sequenziamento metagenomico ha permesso questa identificazione a livello di SGB, fornendo evidenze ad alta risoluzione della sovrapposizione microbica tra cavità orale e intestino.

Questa convergenza batterica suggerisce che la traslocazione microbica attraverso la deglutizione o la circolazione sistemica sia biologicamente plausibile. Tuttavia, è importante sottolineare che la semplice presenza di tali taxa nei campioni fecali non implica necessariamente una colonizzazione attiva della mucosa né una reale integrazione ecologica. I dati attualmente disponibili non consentono di distinguere tra cellule vitali e non vitali, né di stabilire se le specie rilevate siano metabolicamente attive o semplicemente in transito nel lume intestinale. Per corroborare in modo robusto l'ipotesi di una traslocazione orale-intestino, saranno necessari ulteriori dati prospettici. In particolare, studi longitudinali, integrati con analisi metabolomiche e metatrascrittomiche, saranno essenziali per determinare se i microrganismi di origine orale persistano nel tempo nel microbioma intestinale e siano in grado di esercitare un'influenza funzionale sull'interfaccia mucosale.[140]

Sebbene tali taxa condivisi siano stati identificati sia nei pazienti con parodontite sia nei soggetti parodontalmente sani, la loro frequenza e abbondanza differivano significativamente tra i due gruppi, suggerendo che l'asse microbico orale-intestino sia dinamicamente modulato dallo stato della malattia parodontale. Questa osservazione è coerente con l'ipotesi secondo cui la disbiosi orale possa esercitare effetti sistemici attraverso la traslocazione di microrganismi o dei loro metaboliti verso il tratto gastrointestinale.[113,114,116] Evidenze sperimentali ottenute in modelli murini *germ-free* hanno dimostrato che batteri di origine orale, tra cui *Fusobacterium nucleatum*, *Klebsiella* spp. e *Porphyromonas gingivalis*, sono in grado di colonizzare l'intestino, promuovere l'attivazione del sistema immunitario e indurre infiammazione intestinale.[130,131,141,142] I nostri risultati estendono questo modello all'uomo, fornendo evidenze metagenomiche che suggeriscono come patogeni orali associati a parodontite severa possano contribuire a modulare il microbioma intestinale *in vivo*. Tale osservazione, unitamente alla

presenza di pattern immunologici condivisi, potrebbe contribuire a spiegare i risultati di studi precedenti che hanno evidenziato un'associazione tra parodontite e un aumentato rischio di malattie infiammatorie intestinali (IBD) e di altre patologie del tratto intestinale.[113,143]

Per quanto concerne l'α-diversità, nei campioni di placca provenienti dai siti patologici è stata osservata una ricchezza microbica e una diversità di Shannon significativamente più elevate, a supporto dell'ipotesi della sinergia polimicrobica e della disbiosi alla base della patogenesi della malattia parodontale.[144–146] Sebbene non siano emerse differenze statisticamente significative nei campioni di placca dei siti di controllo, saliva e feci, tali risultati devono essere interpretati alla luce della natura preliminare del dataset; la limitata dimensione del campione potrebbe aver ostacolato l'identificazione di variazioni più sottili. Tuttavia, con il progredire dello studio e l'integrazione di ulteriori dati, è verosimile che emergano differenze composizionali e funzionali rilevanti anche in questi compartimenti biologici.

L'analisi tassonomica ha evidenziato una netta dicotomia tra le comunità microbiche associate allo stato di salute e quelle associate alla malattia. Tale pattern differenziale è stato identificato mediante *LefSe*, uno strumento statistico che integra la valutazione della frequenza di rilevamento (ovvero la prevalenza di un taxon all'interno di un gruppo) e della sua abbondanza relativa (la sua rappresentazione proporzionale nei singoli campioni). Questo approccio multilivello consente un'identificazione più biologicamente significativa dei taxa discriminanti, mettendo in evidenza microrganismi che risultano sia ampiamente distribuiti sia quantitativamente dominanti in una specifica condizione, contribuendo così all'identificazione di potenziali biomarcatori microbici in grado di distinguere tra stato di salute e malattia.[147] Nel nostro dataset preliminare, questo approccio ha evidenziato una netta separazione tra i profili microbici associati alla salute parodontale e quelli correlati alla parodontite severa, a livello di placca sottogengivale, saliva e anche nei campioni fecali. In particolare, la coorte con parodontite mostrava un arricchimento di patobionti ben noti - tra cui *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* e *Filifactor alocis* - nei campioni salivari. Al contrario, i soggetti sani presentavano una maggiore proporzione di taxa commensali, come specie appartenenti ai generi *Streptococcus* e *Kingella*. Tali pattern composizionali non erano limitati alla cavità orale; anche i campioni fecali dei pazienti con parodontite mostravano una sovra-abbondanza consistente di *Holdemanella porci*, *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Prevotella clara* e diverse specie non ancora classificate, mentre quelli dei controlli sani conservavano una firma metagenomica distinta, tipicamente associata a condizioni di eubiosi intestinale.

Come precedentemente riportato, diversi patogeni orali identificati nei campioni di placca e saliva sono stati rilevati anche nel microbioma intestinale, rafforzando l'ipotesi di uno scambio microbico attivo e direzionale lungo l'asse orale-intestino. L'identificazione di specie comuni tra compartimenti orale e intestinale nei pazienti con parodontite suggerisce che l'infiammazione e la compromissione della barriera mucosale, caratteristiche della malattia parodontale, possano facilitare la traslocazione microbica oro-intestinale. Tali risultati sono coerenti con un recente studio osservazionale e interventistico condotto da Baima et al., che ha evidenziato, a livello di genere, una maggiore presenza di taxa orali chiave nel microbioma intestinale dei pazienti parodontali, con una riduzione significativa a seguito del trattamento parodontale.[125] Nel complesso, questi risultati suggeriscono l'esistenza di un possibile meccanismo attraverso il quale la salute orale può influenzare la fisiopatologia intestinale e sistemica, con importanti implicazioni per le condizioni infiammatorie croniche. Inoltre, la riduzione osservata di taxa intestinali protettivi, quali *Faecalibacterium prausnitzii* e *Coprococcus eutactus*, associata all'espansione di specie pro-infiammatorie nei campioni fecali dei pazienti con parodontite, potrebbe riflettere le conseguenze immunometaboliche a valle di una disbiosi orale persistente. Questo profilo microbico potrebbe modulare le risposte immunitarie mucosali attraverso la regolazione della produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), la compromissione dell'integrità dell'epitelio intestinale e l'alterazione dell'omeostasi delle cellule T regolatorie. Nel loro insieme, queste evidenze suggeriscono che la malattia parodontale possa contribuire a uno stato sistemico pro-infiammatorio, agendo come fattore di rischio o di aggravamento per patologie extra-orali.

Nonostante la novità e la rilevanza clinica dei nostri risultati, il presente studio presenta alcune limitazioni. Come precedentemente discusso, i risultati attuali derivano da un dataset preliminare con un numero relativamente contenuto di partecipanti, limitando la potenza statistica nell'individuazione di differenze più sottili e la generalizzabilità di specifiche firme microbiche. Inoltre, l'approccio "*omics*" è attualmente limitato al profilo metagenomico e tassonomico; l'annotazione funzionale delle comunità microbiche è in corso e rappresenterà un passaggio cruciale per comprendere il potenziale metabolico delle alterazioni osservate. Un'ulteriore limitazione è costituita dalla natura trasversale dell'analisi, che non consente di stabilire relazioni causali. Future analisi che integrino variabili dell'ospite (quali dieta, BMI, abitudini tabagiche, uso di antibiotici e fattori legati allo stile di vita) e livelli funzionali multi-omici (quali metabolomica, metatrascrittomica e miRNA-omica) sono in corso e saranno fondamentali per chiarire i meccanismi sottostanti l'asse oro-intestinale.

Ciononostante, i nostri dati suggeriscono che il microbioma orale, in particolare in condizioni di disbiosi, possa influenzare il panorama microbico intestinale e che tali alterazioni non siano semplicemente correlate, ma possano contribuire a mediare l'infiammazione sistemica e la suscettibilità alla malattia. Un punto di forza rilevante di questo studio risiede nell'impiego del sequenziamento metagenomico shotgun ad alta risoluzione, che ha consentito l'identificazione di SGB attraverso diverse matrici biologiche. Gli SGB, ovvero genomi microbici ricostruiti da dati metagenomici, permettono un'identificazione tassonomica ad alta risoluzione, superando i limiti del sequenziamento 16S rRNA e includendo anche specie non precedentemente caratterizzate.[148] Per quanto a nostra conoscenza, questo è il primo studio a dimostrare nell'uomo la presenza di specifici SGB orali ben caratterizzati all'interno del microbioma intestinale, fornendo evidenze genomiche dirette della continuità microbica oro-intestinale. Questi risultati aprono nuove prospettive per la pratica clinica, supportando l'implementazione di approcci di profilazione microbica multi-sito per la stratificazione del rischio e il monitoraggio terapeutico. In tale contesto, biomarcatori derivati da saliva, placca e feci potrebbero essere integrati in modelli diagnostici *chairside*, mentre interventi mirati al microbiota (quali probiotici orali o modulazione dietetica) potrebbero essere esplorati non solo per il trattamento della parodontite, ma anche per la riduzione del *burden* infiammatorio sistemico.

6. Conclusioni

I risultati preliminari del presente studio contribuiscono al crescente corpo di evidenze che dimostra come i microbiomi orale e intestinale, pur essendo anatomicamente distinti, siano funzionalmente interconnessi sia in condizioni di salute sia di malattia. L'infiammazione parodontale sembra rimodellare non solo l'ecosistema microbico locale, ma anche quello distale, sottolineando la necessità di considerare la salute orale come una componente integrante dell'omeostasi sistemica. Attraverso l'impiego di sequenziamento metagenomico ad alta profondità, abbiamo identificato una sovrapposizione microbica finora non caratterizzata tra questi ecosistemi, suggerendo che la disbiosi orale possa lasciare tracce rilevabili nel microbioma intestinale. Sebbene la dimostrazione di causalità e della vitalità microbica richieda il completamento del dataset, i risultati attuali forniscono una solida base per avanzare nella comprensione delle dinamiche microbiche lungo l'asse oro-intestinale.

Inoltre, con la progressiva maturazione del nostro dataset longitudinale e il completamento delle analisi funzionali, prevediamo di poter affinare ulteriormente questo continuum microbico e di aprire nuove prospettive per la traduzione clinica, inclusi lo sviluppo di strumenti *chairside* per la valutazione precoce del rischio microbico e strategie di intervento mirate.

Bibliografia

1. Lederberg, J. and McCray, A.T. (2001) 'Ome Sweet 'Omics—A Genealogical Treasury of Words. Scientist, 15, 8.
2. Thompson, L. R. *et al.* A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* **551**, 457–463 (2017).
3. Proctor, L. M. *et al.* The Integrative Human Microbiome Project. *Nature* **569**, 641–648 (2019).
4. Matthijs, G. *et al.* Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *European Journal of Human Genetics* **24**, 2–5 (2016).
5. Lynch, S. V. & Pedersen, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine* **375**, 2369–2379 (2016).
6. Kilian, M. *et al.* The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. *Br Dent J* **221**, 657–666 (2016).
7. Blaser, M. J. *Who Are We? Indigenous Microbes and the Ecology of Human Diseases*. *EMBO reports* vol. 7 (2006).
8. Gillings, M. R., Paulsen, I. T. & Tetu, S. G. Ecology and evolution of the human microbiota: Fire, farming and antibiotics. *Genes* vol. 6 841–857 Preprint at https://doi.org/10.3390/genes6030841 (2015).
9. Cho, I. & Blaser, M. J. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* vol. 13 260–270 Preprint at https://doi.org/10.1038/nrg3182 (2012).
10. Lagier, J.-C. *et al.* RETRACTED ARTICLE: Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol* **1**, 16203 (2016).
11. Fan, Y. & Pedersen, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology* vol. 19 55–71 Preprint at https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9 (2021).
12. Fava, F., Rizzetto, L. & Tuohy, K. M. Gut microbiota and health: connecting actors across the metabolic system. *Proceedings of the Nutrition Society* **78**, 177–188 (2019).
13. Hou, K. *et al.* Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 135 (2022).
14. Salvadori, M. & Rosso, G. Update on the gut microbiome in health and diseases. *World J Methodol* **14**, (2024).
15. Korem, T. *et al.* Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomic samples. *Science (1979)* **349**, 1101–1106 (2015).
16. Zeevi, D. *et al.* Structural variation in the gut microbiome associates with host health. *Nature* **568**, 43–48 (2019).
17. Huttenhower C. et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* (2012).
18. Rothschild, D. *et al.* Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* **555**, 210–215 (2018).
19. Goodrich, J. K. *et al.* Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell* **159**, 789–799 (2014).
20. Jakobsson, H. E. *et al.* Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut* **63**, 559–566 (2014).
21. Rodríguez, J. M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis* **26**, (2015).
22. Gomaa, E. Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* **113**, 2019–2040 (2020).

23. Ray, K. Filling up on fibre for a healthy gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **15**, 67–67 (2018).
24. Zhao, L. *et al.* Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science (1979)* **359**, 1151–1156 (2018).
25. Hughes, R. L. A Review of the Role of the Gut Microbiome in Personalized Sports Nutrition. *Front Nutr* **6**, (2020).
26. Clarke, S. F. *et al.* Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* **63**, 1913–1920 (2014).
27. ALLEN, J. M. *et al.* Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. *Med Sci Sports Exerc* **50**, 747–757 (2018).
28. Estaki, M. *et al.* Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome* **4**, 42 (2016).
29. Biedermann, L. *et al.* Smoking Cessation Induces Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota in Humans. *PLoS One* **8**, e59260 (2013).
30. Biedermann, L. *et al.* Smoking Cessation Alters Intestinal Microbiota. *Inflamm Bowel Dis* **20**, 1496–1501 (2014).
31. Klingensmith, N. J. & Coopersmith, C. M. The Gut as the Motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness. *Crit Care Clin* **32**, 203–212 (2016).
32. Ramnani, P. *et al.* In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe* **18**, 1–6 (2012).
33. Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C. & Jansson, J. K. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology (N Y)* **156**, 3216–3223 (2010).
34. Jakobsson, H. E. *et al.* Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS One* **5**, e9836 (2010).
35. Isaac, S. *et al.* Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **72**, 128–136 (2017).
36. Jackson, M. A. *et al.* Gut microbiota associations with common diseases and prescription medications in a population-based cohort. *Nat Commun* **9**, 2655 (2018).
37. Falony, G. *et al.* Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science (1979)* **352**, 560–564 (2016).
38. Buffie, C. G. & Pamer, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* **13**, 790–801 (2013).
39. Buffie, C. G. *et al.* Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to Clostridium difficile. *Nature* **517**, 205–208 (2015).
40. Forslund, K. *et al.* Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* **528**, 262–266 (2015).
41. Wu, H. *et al.* Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med* **23**, 850–858 (2017).
42. Ahlawat, S., Asha & Sharma, K. K. Gut–organ axis: a microbial outreach and networking. *Lett Appl Microbiol* **72**, 636–668 (2021).
43. RIBALDONE, D. G., PELLICANO, R., FAGOONEE, S. & ACTIS, G. C. Modulation of the gut microbiota: opportunities and regulatory aspects. *Minerva Gastroenterology* **69**, (2023).
44. Afzaal, M. *et al.* Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Front Microbiol* **13**, (2022).
45. Anderson, J. W. *et al.* Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev* **67**, 188–205 (2009).
46. Louis, P. & Flint, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* **19**, 29–41 (2017).

47. Chambers, E. S., Preston, T., Frost, G. & Morrison, D. J. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Curr Nutr Rep* **7**, 198–206 (2018).
48. Rauf, A. *et al.* Recent advances in the therapeutic application of short-chain fatty acids (SCFAs): An updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **62**, 6034–6054 (2022).
49. de Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M. & Cani, P. D. Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut* **71**, 1020–1032 (2022).
50. Holz IV, G. G., Kiihtreiber, W. M. & Habener, J. F. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature* **361**, 362–365 (1993).
51. Facchin, S. *et al.* Short-Chain Fatty Acids and Human Health: From Metabolic Pathways to Current Therapeutic Implications. *Life* **14**, 559 (2024).
52. Cani, P. D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* **67**, 1716–1725 (2018).
53. Wang, M. *et al.* In vitro colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota. *Trends Food Sci Technol* **88**, 1–9 (2019).
54. Havenaar, R. Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: a review. *Benef Microbes* **2**, 103–114 (2011).
55. Steliou, K., Boosalis, M. S., Perrine, S. P., Sangerman, J. & Faller, D. V. Butyrate Histone Deacetylase Inhibitors. *Biores Open Access* **1**, 192–198 (2012).
56. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180 (2011).
57. LeBlanc, J. G. *et al.* Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol* **24**, 160–168 (2013).
58. Nicholson, J. K. *et al.* Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science (1979)* **336**, 1262–1267 (2012).
59. Forster, V. J., McDonnell, A., Theobald, R. & McKay, J. A. Effect of Methotrexate/Vitamin B_{12} on DNA Methylation as a Potential Factor in Leukemia Treatment-Related Neurotoxicity. *Epigenomics* **9**, 1205–1218 (2017).
60. Ramírez-Macías, I. *et al.* Novel insights in the relationship of gut microbiota and coronary artery diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* **62**, 3738–3750 (2022).
61. Karczewski, J. *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**, G851–G859 (2010).
62. Bron, P. A. *et al.* Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *British Journal of Nutrition* **117**, 93–107 (2017).
63. Singh, R. K. *et al.* Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med* **15**, 73 (2017).
64. Rooks, M. G. & Garrett, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* **16**, 341–352 (2016).
65. Tofalo, R., Cocchi, S. & Suzzi, G. Polyamines and Gut Microbiota. *Front Nutr* **6**, (2019).
66. Lazar, V. *et al.* Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Front Immunol* **9**, (2018).
67. Spencer, S. P., Fragiadakis, G. K. & Sonnenburg, J. L. Pursuing Human-Relevant Gut Microbiota-Immune Interactions. *Immunity* **51**, 225–239 (2019).
68. Schluter, J. *et al.* The gut microbiota is associated with immune cell dynamics in humans. *Nature* **588**, 303–307 (2020).
69. Wiertsema, S. P., van Bergenhenegouwen, J., Garssen, J. & Knippels, L. M. J. The Interplay between the Gut Microbiome and the Immune System in the Context of

Infectious Diseases throughout Life and the Role of Nutrition in Optimizing Treatment Strategies. *Nutrients* **13**, 886 (2021).
70. Francino, M. Early Development of the Gut Microbiota and Immune Health. *Pathogens* **3**, 769–790 (2014).
71. Uzbay, T. Germ-free animal experiments in the gut microbiota studies. *Curr Opin Pharmacol* **49**, 6–10 (2019).
72. Mörbe, U. M. *et al.* Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunol* **14**, 793–802 (2021).
73. Adak, A. & Khan, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**, 473–493 (2019).
74. Wu, H.-J. & Wu, E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes* **3**, 4–14 (2012).
75. Rinninella, E. *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **7**, 14 (2019).
76. Bhattarai, Y., Muniz Pedrogo, D. A. & Kashyap, P. C. Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **312**, G52–G62 (2017).
77. Salonen, A., de Vos, W. M. & Palva, A. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: present state and perspectives. *Microbiology (N Y)* **156**, 3205–3215 (2010).
78. Frank, D. N. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 13780–13785 (2007).
79. Machiels, K. *et al.* A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1275–1283 (2014).
80. Wang, T. *et al.* Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J* **6**, 320–329 (2012).
81. Kostic, A. D. *et al.* Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* **22**, 292–298 (2012).
82. Wang, N. & Fang, J.-Y. Fusobacterium nucleatum, a key pathogenic factor and microbial biomarker for colorectal cancer. *Trends Microbiol* **31**, 159–172 (2023).
83. Yu, T. *et al.* Fusobacterium nucleatum Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* **170**, 548-563.e16 (2017).
84. Marasco, G. *et al.* Gut Microbiota and Celiac Disease. *Dig Dis Sci* **61**, 1461–1472 (2016).
85. Ley, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 11070–11075 (2005).
86. Cao, S.-Y. *et al.* Dietary plants, gut microbiota, and obesity: Effects and mechanisms. *Trends Food Sci Technol* **92**, 194–204 (2019).
87. Larsen, N. *et al.* Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS One* **5**, e9085 (2010).
88. Qin, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55–60 (2012).
89. Cattaneo, A. *et al.* Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol Aging* **49**, 60–68 (2017).
90. Vogt, N. M. *et al.* Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep* **7**, 13537 (2017).
91. Bajaj, J. S. *et al.* Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **302**, G168–G175 (2012).

92. Li, Q., Han, Y., Dy, A. B. C. & Hagerman, R. J. The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci* **11**, (2017).
93. Gest, H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society. *Notes Rec R Soc Lond* **58**, 187–201 (2004).
94. Escapa, I. F. *et al.* New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract. *mSystems* **3**, (2018).
95. Mark Welch, J. L., Ramírez-Puebla, S. T. & Borisy, G. G. Oral Microbiome Geography: Micron-Scale Habitat and Niche. *Cell Host Microbe* **28**, 160–168 (2020).
96. Marsh, P. D. & Zaura, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol* **44**, (2017).
97. Simon-Soro, A. *et al.* Polymicrobial Aggregates in Human Saliva Build the Oral Biofilm. *mBio* **13**, (2022).
98. Dal Co, A., van Vliet, S., Kiviet, D. J., Schlegel, S. & Ackermann, M. Short-range interactions govern the dynamics and functions of microbial communities. *Nat Ecol Evol* **4**, 366–375 (2020).
99. Baker, J. L., Mark Welch, J. L., Kauffman, K. M., McLean, J. S. & He, X. The oral microbiome: diversity, biogeography and human health. *Nat Rev Microbiol* **22**, 89–104 (2024).
100. Struzycka, I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol* **63**, 127–35 (2014).
101. Marsh, P. D. Microbiology of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and Caries. *Dent Clin North Am* **54**, 441–454 (2010).
102. Papapanou, P. N. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* **89**, (2018).
103. Aimetti, M. *et al.* Prevalence of periodontitis in an adult population from an urban area in North Italy: findings from a cross-sectional population-based epidemiological survey. *J Clin Periodontol* **42**, 622–631 (2015).
104. Chapple, I. L. C. *et al.* Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol* **42**, (2015).
105. Kassebaum, N. J. *et al.* Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res* **96**, 380–387 (2017).
106. Kassebaum, N. J. *et al.* Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010. *J Dent Res* **93**, 1045–1053 (2014).
107. Tonetti, M. S., Jepsen, S., Jin, L. & Otomo-Corgel, J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol* **44**, 456–462 (2017).
108. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**, 134–144 (1998).
109. Ozuna, H. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Filifactor alocis: Two exotoxin-producing oral pathogens. *Frontiers in Oral Health* **3**, (2022).
110. Martínez, A., Kuraji, R. & Kapila, Y. L. The human oral virome: Shedding light on the dark matter. *Periodontol 2000* **87**, 282–298 (2021).
111. Hajishengallis, G. & Chavakis, T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol* **21**, 426–440 (2021).
112. Baima G, R. D. M. M. R. F. C. F. A. A. A. M. Can periodontitis affect the health and disease of the digestive system? A comprehensive review of epidemiological evidence and biological mechanisms. *Curr Oral Health Rep* (2021).

113. Tanwar, H. *et al.* Unravelling the oral-gut axis: Interconnection between periodontitis and infammatory bowel disease, current challenges, and future perspective. *Journal of Crohn's and Colitis* vol. 18 1319–1341 Preprint at https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjae028 (2024).
114. Han, N. *et al.* The impacts of oral and gut microbiota on alveolar bone loss in periodontitis. *Journal of Periodontal Research* vol. 58 1139–1147 Preprint at https://doi.org/10.1111/jre.13168 (2023).
115. Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Hein, R., Schmidt, T. M. & Kamada, N. The Bacterial Connection between the Oral Cavity and the Gut Diseases. *J Dent Res* **99**, 1021–1029 (2020).
116. Lockhart, P. B. *et al.* Bacteremia Associated With Toothbrushing and Dental Extraction. *Circulation* **117**, 3118–3125 (2008).
117. Parahitiyawa, N. B., Jin, L. J., Leung, W. K., Yam, W. C. & Samaranayake, L. P. Microbiology of Odontogenic Bacteremia: beyond Endocarditis. *Clin Microbiol Rev* **22**, 46–64 (2009).
118. Forner, L., Larsen, T., Kilian, M. & Holmstrup, P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* **33**, 401–407 (2006).
119. Pedersen, A., Bardow, A., Jensen, S. B. & Nauntofte, B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* **8**, 117–129 (2002).
120. Ding, T. & Schloss, P. D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature* **509**, 357–360 (2014).
121. Segata, N. *et al.* Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol* **13**, R42 (2012).
122. Walker, M. Y. *et al.* Role of oral and gut microbiome in nitric oxide-mediated colon motility. *Nitric Oxide* **73**, 81–88 (2018).
123. Schmidt, T. S. *et al.* Extensive transmission of microbes along the gastrointestinal tract. *Elife* **8**, (2019).
124. Baima, G. *et al.* Effect of Periodontitis and Periodontal Therapy on Oral and Gut Microbiota. *J Dent Res* **103**, 359–368 (2024).
125. Lourenço, T. G. B., Spencer, S. J., Alm, E. J. & Colombo, A. P. V. Defining the gut microbiota in individuals with periodontal diseases: an exploratory study. *J Oral Microbiol* **10**, 1487741 (2018).
126. Bao, J. *et al.* Periodontitis may induce gut microbiota dysbiosis via salivary microbiota. *Int J Oral Sci* **14**, 32 (2022).
127. Li, B. *et al.* Oral bacteria colonize and compete with gut microbiota in gnotobiotic mice. *Int J Oral Sci* **11**, (2019).
128. Seedorf, H. *et al.* Bacteria from Diverse Habitats Colonize and Compete in the Mouse Gut. *Cell* **159**, 253–266 (2014).
129. Kitamoto, S. *et al.* The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. *Cell* **182**, 447-462.e14 (2020).
130. Atarashi, K. *et al.* Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives T_H 1 cell induction and inflammation. *Science (1979)* **358**, 359–365 (2017).
131. Könönen, E. & Gursoy, U. K. Oral Prevotella Species and Their Connection to Events of Clinical Relevance in Gastrointestinal and Respiratory Tracts. *Front Microbiol* **12**, (2022).
132. Kunath, B. J., De Rudder, C., Laczny, C. C., Letellier, E. & Wilmes, P. The oral–gut microbiome axis in health and disease. *Nat Rev Microbiol* **22**, 791–805 (2024).
133. Segata, N. On the Road to Strain-Resolved Comparative Metagenomics. *mSystems* **3**, (2018).
134. Thomas, A. M. & Segata, N. Multiple levels of the unknown in microbiome research. *BMC Biol* **17**, 48 (2019).

135. Pasolli, E. *et al.* Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell* **176**, 649-662.e20 (2019).
136. Beghini, F. *et al.* Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. *Elife* **10**, (2021).
137. Aimetti, M., Cacciatore, S., Graziano, A. & Tenori, L. Metabonomic analysis of saliva reveals generalized chronic periodontitis signature. *Metabolomics* **8**, 465–474 (2012).
138. Blanco-Míguez, A. *et al.* Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlAn 4. *Nat Biotechnol* **41**, 1633–1644 (2023).
139. Daliri, E. B.-M., Ofosu, F. K., Chelliah, R., Lee, B. H. & Oh, D.-H. Challenges and Perspective in Integrated Multi-Omics in Gut Microbiota Studies. *Biomolecules* **11**, 300 (2021).
140. Sohn, J. *et al. Porphyromonas gingivalis* indirectly elicits intestinal inflammation by altering the gut microbiota and disrupting epithelial barrier function through IL9-producing CD4 $^{+}$ T cells. *Mol Oral Microbiol* **37**, 42–52 (2022).
141. Ou, S. *et al.* Fusobacterium nucleatum and colorectal cancer: From phenomenon to mechanism. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, (2022).
142. Baima, G. *et al.* Shared microbiological and immunological patterns in periodontitis and IBD: A scoping review. *Oral Dis* **28**, 1029–1041 (2022).
143. Belibasakis, G. N. *et al.* Periodontal microbiology and microbial etiology of periodontal diseases: Historical concepts and contemporary perspectives. *Periodontol 2000* (2023) doi:10.1111/prd.12473.
144. Curtis, M. A., Diaz, P. I. & Van Dyke, T. E. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol 2000* **83**, 14–25 (2020).
145. Hajishengallis, G. & Lamont, R. J. Polymicrobial communities in periodontal disease: Their quasi-organismal nature and dialogue with the host. *Periodontol 2000* **86**, 210–230 (2021).
146. Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* **12**, R60 (2011).
147. Pasolli, E. *et al.* Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell* **176**, 649-662.e20 (2019).