

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



DIPARTIMENTO DI MEDICINA, CHIRURGIA E ODONTOIATRIA
"SCUOLA MEDICA SALERNITANA"

DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA TRASLAZIONALE DELLO SVILUPPO E DELL'INVECCHIAMENTO ATTIVO
XXXIV CICLO

CURRICULUM : MARCATORI MOLECOLARI, RADIOLOGICI, CLINICI E COGNITIVO-
COMPORTAMENTALI DELLO SVILUPPO E DEL DECLINO FUNZIONALE
COORDINATORE PROF. PALMIERO MONTELEONE

Tesi di Dottorato

**"PROFILO MICROBIOMICO E METABOLOMICO IN SOGGETTI CON
ANORESSIA NERVOSA PRIMA E DOPO RECUPERO DI PESO: UN
APPROCCIO MULTI-OMICO"**

Relatore
Ch.mo Prof. Palmiero Monteleone

Candidato
Dott.ssa Francesca Marciello
Matricola 8800900032

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1.	INTRODUZIONE.....	1
	1.1 Background.....	1
	1.2 Microbioma e Disturbi dell'Alimentazione.....	4
	1.3 Metaboloma e Disturbi dell'Alimentazione.....	6
	1.4 Obiettivi dello studio.....	17
2.	MATERIALI E METODI.....	19
	2.1 Partecipanti.....	19
	2.2 Valutazioni cliniche.....	20
	2.3 Raccolta del campione fecale.....	21
	2.4 Dati dietetici.....	22
	2.5 Analisi del Microbioma.....	22
	2.6 Analisi Metabolomica.....	23
	2.6.1 GasCromatografia-Spettrometria di Massa (CG-MS).....	23
	2.6.2 Controlli di qualità dell'analisi GC-MS.....	25
	2.7 Analisi Statistica.....	26
	2.7.1 Dati demografici e clinici.....	26
	2.7.2 Analisi del Microbioma.....	26
	2.7.3 Analisi Metabolomica.....	28
	2.7.4 Selezione dei metaboliti rilevanti.....	29
	2.7.5 Integrazione Microbioma - Metaboloma.....	32
3.	RISULTATI.....	33
	3.1 Dati clinici e demografici.....	33
	3.2 Microbioma.....	34
	3.3 Metaboloma.....	35
	3.4 Integrazione Microbioma - Metaboloma.....	37
	3.5 Microbioma e caratteristiche cliniche.....	38
4.	DISCUSSIONE.....	40
5.	CONCLUSIONI.....	53
6.	BIBLIOGRAFIA.....	54
7.	TABELLE E FIGURE.....	70

1. INTRODUZIONE

1.1 Background

L'anoressia nervosa (AN) è un disturbo psichiatrico caratterizzato da restrizione alimentare con conseguente basso peso per età e/o curve di crescita, intensa paura di aumentare di peso, inappropriato valore attribuito al peso e alla forma fisica e anomalia nel modo in cui viene percepito il proprio peso e immagine corporea [1]. Tale psicopatologia porta ad alterati comportamenti alimentari quali digiuno, restrizione alimentare, abbuffate con vomito autoindotto, uso improprio di diuretici, lassativi e iperattività fisica, cui consegue malnutrizione, responsabile, a sua volta, di una larga compagine di complicanze organiche severe potenzialmente pericolose per la vita.

Sebbene l'eziopatogenesi dell'AN non sia ancora completamente conosciuta, sono stati proposti come possibili meccanismi patogenetici alcune alterazioni nei sistemi di regolazione dell'alimentazione [2,3]. Recentemente, è stato ipotizzato un ruolo rilevante del microbiota intestinale tra i meccanismi regolatori dell'appetito, del peso corporeo e delle funzioni cerebrali capaci di assumere un ruolo nella fisiopatologia dell'AN. Pertanto, un'idea

emergente è che il microbiota intestinale potrebbe contribuire allo sviluppo di questo disturbo [4].

Il microbiota intestinale produce una serie di metaboliti bioattivi capace di entrare nella circolazione sistemica e di esercitare profondi effetti su vari processi fisiologici, che possono avere una potenziale influenza sul comportamento umano [5]. Studi recenti hanno dimostrato che topi privi di carica microbica intestinale presentano alterazioni nella risposta allo stress, nella biochimica del Sistema Nervoso Centrale (SNC) e nel comportamento indicativi di una riduzione dei livelli di ansia rispetto a topi normali [6]. È stato riportato, inoltre, che la colonizzazione intestinale di topi adulti privati di germi con una comunità microbica intestinale distale raccolta da topi allevati in modo convenzionale, produce un drammatico aumento del grasso corporeo, nonostante una diminuzione del consumo di cibo [7]. Un'altra rilevante osservazione è stata quella secondo cui la composizione del microbiota intestinale differisce in maniera rilevante tra soggetti obesi e normopeso e il coinvolgimento del microbiota intestinale nella sindrome metabolica [8-10]. Inoltre, è stato chiaramente dimostrata l'esistenza di una comunicazione bidirezionale tra tratto gastrointestinale e cervello, essenziale per il mantenimento dell'omeostasi corporea [11]. Pertanto, è possibile postulare che nei soggetti con AN le alterazioni quantitative e qualitative nell'assunzione di cibo, l'iperattività fisica,

lo stress emotivo, l'ansia e la depressione possano alterare l'omeostasi del microbiota intestinale e quindi modificarne la composizione.

Queste osservazioni hanno stimolato la ricerca nell'esplorazione della composizione del microbiota intestinale nell'AN. Di fatto, la presenza di disbiosi del microbiota intestinale è stata già segnalata nei soggetti affetti da AN in fase attiva e negli individui con solo parziale recupero ponderale, sebbene i risultati siano spesso non concordi tra i diversi studi [12,13]. Inoltre, solo pochi studi hanno esplorato la produzione di metaboliti microbici fecali che hanno potenziali effetti sulle funzioni corporee [14,15]. L'identificazione di metaboliti associati all'AN potrebbe essere di supporto nell'individuazione di specifici biomarcatori capaci di contribuire al miglioramento della comprensione della fisiopatologia del disturbo e fornire possibili bersagli per nuovi e sempre più mirati trattamenti farmacologici. Un approccio metabolomico può essere utile a questo scopo: un recente studio ha individuato l'esistenza di specifici profili metabolomici fecali negli individui con AN in fase acuta e con recente recupero ponderale [15].

Lo studio dell'associazione tra tali cambiamenti metabolomici e le modifiche specifiche nel profilo del microbioma intestinale potrebbe fornire un quadro più completo del ruolo del microbiota intestinale nella fisiopatologia dell'AN.

1.2 Microbioma e Disturbi dell'Alimentazione

Date le evidenze crescenti relative al ruolo del microbioma sull'equilibrio metabolico ed energetico dell'organismo e sulla sfera comportamentale ed emotiva, vi è stato negli ultimi anni un grosso interesse scientifico rivolto alla caratterizzazione della comunità microbica enterica degli individui affetti da Disturbi dell'Alimentazione. Tuttavia, sebbene sia stato estensivamente studiato il ruolo del microbioma nello sviluppo e mantenimento nell'obesità, ancora pochi studi sono stati condotti per esplorare tale ruolo nei disturbi dell'alimentazione. In particolare, gli studi presenti in letteratura si focalizzano essenzialmente sull'AN. Il primo studio prospettico, volto ad indagare le variazioni del microbioma intestinale in relazione ai cambiamenti del peso corporeo, è stato pubblicato da Kleiman e colleghi [16] che hanno caratterizzato il microbioma fecale di un piccolo gruppo di pazienti con AN al momento del ricovero (n = 16) e alla dimissione (n = 10). I pazienti affetti da AN in fase acuta mostravano significativa ridotta diversità alfa (diversità intra-individuale delle specie microbiche) rispetto ai controlli sani. La diversità alfa era associata alla psicopatologia del disturbo alimentare; infatti, specie batteriche ridotte risultavano associate con un aumento della depressione e delle preoccupazioni

per il peso e la forma [16]. Mentre lo stato del microbioma fecale migliorava nei soggetti con AN dopo il recupero del peso, la diversità alfa continuava ad essere significativamente ridotta nel gruppo con AN alla dimissione e una differenza significativa nella beta diversità si osservava anche nei soggetti con AN tra l'inizio del ricovero e la dimissione [16]. Questo suggerisce che le alterazioni nel microbioma intestinale possono essere caratteristiche di tratto e quindi possano svolgere un ruolo causale nell'AN, piuttosto che esser semplicemente una conseguenza della malnutrizione o basso peso corporeo. La maggior parte, ma non tutti, gli studi sul microbioma fecale nell'AN hanno riportato un certo livello di disbiosi intestinale [17-21]. Mentre alcuni studi hanno riscontrato la medesima diminuzione della diversità alfa nei pazienti con AN in fase acuta riportata nel primo studio [22,23], altri hanno presentato risultati discordi [18,19,24] (Tabella 1).

Assumendo che la disbiosi intestinale possa comportarsi come un mediatore critico dell'AN, è stata ipotizzata anche la possibilità di un suo diretto utilizzo mirato a migliorare i sintomi del disturbo.

A sostegno di questa ipotesi, esistono alcuni studi che riportano risultati promettenti dell'utilizzo del trapianto di microbioma fecale in soggetti con AN. In un caso clinico, un paziente con AN con significativa disfunzione della barriera intestinale e bassa diversità alfa ha mostrato miglioramenti in entrambe le misure in seguito al

trapianto di microbioma fecale da un parente sano di primo grado [25]. In questo caso, si è osservato anche un aumento dei livelli di acidi grassi a catena corta e serotonina [25]. In un altro studio, un paziente con AN ha mostrato un miglioramento significativo in termini di aumento di peso dopo il trapianto di microbioma fecale da una donatrice sana non imparentata [26]. Questo aumento di peso è stato determinato principalmente da un aumento del 55% del grasso corporeo nonostante un apporto calorico stabile [26]. Considerando che tali osservazioni si basano su pochi case report le conclusioni vanno interpretate con massima cautela e si rendono necessari, dunque, ulteriori studi randomizzati e controllati per valutare l'impatto terapeutico del trapianto di microbioma fecale nell'AN. Tuttavia, è interessante notare che questi case report forniscono una prova della possibilità di utilizzare il trattamento della disbiosi intestinale come approccio terapeutico aggiuntivo nell'AN.

1.3 Metaboloma e Disturbi dell'Alimentazione

La metabolomica un'area consolidata volta alla rilevazione dell'insieme dei metaboliti presenti nei sistemi biologici. Lo scopo di questo approccio è quello di raccogliere i dati quantitativi su un'ampia gamma di metaboliti per ottenere un'immagine globale dei cambiamenti metabolici connessi con una malattia. Il profilo

metabolomica è costituito da composti organici ed inorganici di basso peso molecolare che sono compresi nelle varie vie metaboliche come substrati, mediatori e da prodotti delle reazioni biochimiche cellulari enzima-mediate. Queste piccole molecole, tra cui lipidi, zuccheri, amminoacidi, nucleotidi e una serie di diverse molecole organiche, sono reagenti, intermedi o prodotti di reazioni biochimiche e sono i costituenti di altre molecole come le proteine, gli acidi nucleici e le membrane cellulari. Le strategie di metabolomica sono state divise in due approcci distinti: *untargeted* e *targeted*. L'approccio metabolomica *untargeted* è l'analisi completa di tutti gli analiti misurabili in un campione, compreso i composti chimici sconosciuti (unknown). Al contrario, l'approccio *targeted* è basato sulla misura dei gruppi ben definiti dei metaboliti noti. Un protocollo di analisi metabolomica richiede un approccio integrato che comprende la preparazione dei campioni, la standardizzazione, la taratura, i metodi di separazione, la rilevazione dei metaboliti e analisi dei dati. I metodi di preparazione e separazione dei campioni sono necessari per semplificare miscele complesse, data la difficoltà nell'analizzare simultaneamente un gran numero di metaboliti con proprietà differenti. I metodi di separazione più frequentemente utilizzati sono la gascromatografia (GC), la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e l'elettroforesi capillare (CE). Solitamente questi metodi di separazione sono accoppiati alla spettrometria di

massa (MS) come metodo di rivelazione (quindi GC-MS o LC-MS). Altre tecniche analitiche utilizzate nella rilevazione dei metaboliti sono la risonanza magnetica nucleare (NMR), la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) e la spettroscopia Raman.

La metabolomica è considerato un approccio interessante per identificare i biomarcatori utili per sviluppare le strategie target per la diagnosi e il trattamento di diverse condizioni patologiche. Diversi studi hanno utilizzato, dunque, tale approccio nell'ottica di individuare possibili biomarcatori dell'AN. I principali risultati sono schematizzati nella Tabella 2.

Partendo dall'assunto che l'AN è associata a disregolazione di diversi sistemi endocrini con ipercolesterolemia, ipogonadismo ipogonadotropico con deficit di estrogeni e androgeni, resistenza dell'ormone della crescita e alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, Bulant ad al. [27] hanno usato un approccio metabolomico per meglio valutare l'effetto della rialimentazione sul profilo degli steroidi in campioni di siero di donne ospedalizzate con AN. Infatti, il disegno dello studio era di investigare l'effetto dell'ospedalizzazione sul metaboloma degli steroidi in 33 donne con AN sia il tipo restrittivo che purgativo e la relazione fra IMC e due adipochine, 45 steroidi circolanti (28 non coniugati e 17 coniugati) e indici specifici e non specifici del disturbo. Lo studio ha mostrato un effetto endocrino della rialimentazione testimoniato da un aumento

significativo della leptina e un cambiamento non significativo della ghrelina, e dalla correlazione positiva tra numerosi steroidi circolanti e l'IMC come testimonianza di un decadimento critico della steroidogenesi nelle pazienti con condizioni di malnutrizione più gravi. In particolare, tramite GC-MS in modalità di monitoraggio ionico selezionato (SIM), le attività di 7β - e 16α -idrossilazione risultavano aumentate negli individui con AN con IMC più basso e diminuivano durante l'ospedalizzazione. Infatti, sono state trovate concentrazioni significativamente diminuite di 7β -idrossi-metaboliti di $C_{19}\Delta^5$ steroidi. Al contrario, in soggetti con AN e livello di malnutrizione meno grave l'attività di 7α -idrossilazione era più alta e il rapporto tra 5-androstene- $3\beta,7\alpha,17\beta$ -triolo e 5-androstene- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triolo aumentava durante il ricovero.

Un altro studio che ha applicato l'approccio metabolomico in una popolazione composta da soggetti con AN in fase acuta del disturbo, dopo remissione e da controlli sani è stato condotto per valutare le alterazioni del pathway del metabolismo del moncarbonio [28]. Questa via è di grande interesse considerando che i micronutrienti in questione permettono la produzione della metionina e quindi la metilazione del DNA. Lo studio ha indagato le associazioni tra i cambiamenti dell'IMC pre- e post-trattamento e i cambiamenti pre- e post-trattamento nei livelli di nutrienti (colina, betaina, metionina) nel siero di soggetti con AN sottotipo binge-

purging e restrittivo. I principali risultati hanno mostrato un aumento dei livelli di B12 nell'AN in fase attiva, e nessuna variazione statisticamente significativa nei livelli di colina e metionina rispetto ai soggetti con AN in remissione e ai controlli come se esistesse un adattamento compensativo alla malnutrizione. Inoltre, le alterazioni non erano associate al sottotipo di AN a significare che le differenze nei livelli di nutrienti sono attribuibili alla malnutrizione piuttosto che alle condotte di eliminazione.

In uno studio preclinico condotto su ratti di sesso femminile, Cifani et al. [29] hanno caratterizzato il profilo metabolico del comportamento binge-eating. A tal fine, gli autori hanno analizzato mediante spettroscopia NMR il siero di 4 gruppi di ratti (1. no restrizione alimentare e non stressati, 2. no restrizione alimentare e stressati, 3. restrizione alimentare e non stressati, 4. restrizione alimentare e stressati) al fine di identificare potenziali marcatori biochimici e trovando che metaboliti quali le glicoproteine, thr, gly, Gln, ac e lac possono essere biomarcatori importanti per la condotta binge-eating.

Per quanto riguarda il BED, il lavoro di Leyrolle et al. [30] mirava ad esaminare il profilo biologico e clinico di 101 pazienti obesi con e senza BED. Così, hanno applicato un approccio metabolomico *untarget* in campioni di plasma di 39 pazienti osservando che nel BED, all'analisi unidimensionale, erano presenti

alti livelli significativi di bisfenolo A bis (2,3-diidrossipropil) etere (BADGE.2H₂O), un composto presente nell'industria dell'imballaggio alimentare e isovalerilcarnitina, un metabolita della carnitina e dell'isovalerato.

Salehi et al. [31] hanno eseguito uno studio di metabolomica basato sulla spettroscopia ¹H NMR per delineare il profilo metabolomico sui campioni di siero in soggetti con AN sia in fase attiva che dopo recupero ponderale confrontato con controlli sani. Studiando la concentrazione sierica di 21 metaboliti, gli autori hanno trovato all'analisi univariata concentrazioni più alte di glutammina ma più basse di metanolo, glucosio, glicoproteine nell'AN; all'analisi multivariata il metanolo risultava più basso sia nell'AN acuta che nell'AN in remissione rispetto ai controlli. Nel complesso, questo studio suggerisce che il metanolo potrebbe essere un importante marcatore di tratto per l'AN, mentre la glutammina, il glucosio, le glicoproteine potrebbero essere considerati indicatori di stato, considerando la loro capacità di essere alterati solo durante la fase acuta, ma normalizzandosi dopo recupero ponderale.

Considerando l'ipotesi emergente del ruolo del microbiota intestinale come fattore capace di influenzare la psicopatologia dell'AN, Miyata et al. [32] hanno confrontato il profilo dei metaboliti sierici derivati dal microbioma intestinale di 10 pazienti donne AN sottotipo restrittivo confrontato con un gruppo di controllo

attraverso un approccio *untargeted* combinando UPLC-MS e CE-MS. Il profilo di metabolomica emerso in questo studio ha mostrato 275 metaboliti di cui 19 sono risultati significativamente differenti fra i soggetti con AN e il gruppo di controllo. La maggior parte di questi sono risultati significativamente inferiori nel gruppo AN che nei controlli come alanina, asparagina, betaina, istidina, allo-isoleucina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, taurina, tirosina. Inoltre, questo studio ha riportato anche un aumento delle tossine uremiche nei sieri dei pazienti con AN. In sintesi, gli autori hanno descritto un profilo particolare del metaboloma sierico in soggetti con AN caratterizzato da livelli diminuiti di amminoacidi essenziali e non essenziali e livelli aumentati di composti derivati dalle tossine uremiche.

Diversi studi hanno riportato una disregolazione degli acidi grassi nel sangue di individui con AN, soprattutto gli acidi grassi n-3 coinvolti nello sviluppo del SNC e nelle diverse funzioni cognitive. È stato notato che una minore assunzione di lipidi nella dieta è correlata alla durata della malattia nei pazienti affetti da AN come se la restrizione dell'intake di lipidi fosse correlata a qualche cambiamento metabolico che potrebbe influenzare la patogenesi della malattia [33,34]. Inoltre, i pazienti con una tendenza più accentuata all'evitamento dell'assunzione di grassi sembrano avere una prognosi peggiore [34,35]. Così, gli acidi grassi sono stati

considerati come possibili biomarcatori nell'AN. Partendo da tutte queste considerazioni, Nguyen et al. [36] ha ipotizzato non solo l'esistenza di una alterazione nel profilo metabolico dei lipidi nell'AN (sia di tratto che di stato) ma anche la correlazione tra questa alterazione con specifici fenotipi clinici della malattia. Il disegno dello studio consisteva nell'analizzare le concentrazioni plasmatiche degli acidi grassi (26 composti, compresi saturi e insaturi) mediante GC-MS in campioni ottenuti sia a digiuno (T0) che nel periodo post-prandiale (T1) in una popolazione composta da donne con AN in fase attiva, in fase di remissione e da controlli sani. Come previsto, le donne con AN e i controlli sani hanno mostrato un profilo degli acidi grassi indicativo dell'esistenza di un metabolismo lipidico disregolato: nell'AN, acido laurico saturo, acido alfa-linoleico polinsaturo n-3, acido eicosapentaenoico, acido docosapentaenoico al T0 e acido alfa-3 polinsaturo n-3L'acido linoleico al T1 hanno mostrato aumenti significativi rispetto ai controlli. Inoltre, è stata dimostrata una correlazione tra questa alterazione degli acidi grassi e caratteristiche quali l'IMC, la depressione e l'ansia.

Più recentemente, considerando le evidenze che suggeriscono una disregolazione nelle concentrazioni ematiche dei lipidi nell'AN, l'aumento della concentrazione di colesterolo dopo il ripristino del peso e l'associazione tra il ripristino del peso a breve termine e la deposizione adiposa centrale, Tam et al. [37] hanno progettato un

lavoro per analizzare il lipidoma plasmatico in 39 pazienti sottopeso con AN in fase acuta, dopo il ripristino del peso a breve termine e in 37 partecipanti sani. I pazienti con AN in fase acuta hanno mostrato un aumento delle concentrazioni di diverse classi di lipidi rispetto ai controlli sani, in particolare, colesterolo e altri metaboliti della lecitina-colesterolo acil transferasi, esteri di colesterolo, lisifosfatidilcolina, lisifosfatidiletolamina, fosfatidilinositolo e sfingomieline. Dopo recupero ponderale, il profilo lipidomico è risultato profondamente alterato con un aumento delle concentrazioni di lipidi e dei più brevi e più saturi triacilgliceroli. Questi risultati richiamano l'attenzione sulla presenza di una disregolazione lipidica, simile a quella osservabile nell'obesità e nella sindrome metabolica, dopo il programma di ripristino del peso a breve termine nell'AN.

Nel tentativo di delineare il profilo metabolomico in fasi differenti di AN, Focker e colleghi hanno effettuato due studi differenti [14,38]. Nel primo studio, sono state analizzate le concentrazioni di 163 metaboliti in un gruppo di 29 pazienti con AN durante la fase acuta e dopo il recupero di peso a breve termine e confrontate con 16 controlli sani. Gli autori hanno trovato una lieve iperaminoacidemia nei pazienti, con concentrazioni significativamente aumentate di glutammina, glicina, istidina, leucina, metionina, ornitina, fenilalanina, serina e triptofano. Le

concentrazioni dei metaboliti nel gruppo di controllo sono risultate maggiormente diverse da quelle dei pazienti con AN dopo recupero del peso a breve termine rispetto alla fase acuta del disturbo. In un ulteriore studio, gli stessi ricercatori hanno provato ad individuare con approccio *targeted* alterazioni metaboliche durante ricovero ospedaliero e dopo recupero di peso a breve e, anche, a lungo termine in 35 adolescenti con AN rispetto a 25 controlli sani. Analizzando le concentrazioni di 187 metaboliti, hanno riportato un aumento significativo di glutammina, glicina, istidina, serina e triptofano. Inoltre, i cambiamenti più significativi sono stati evidenziati tra AN acuta e durante il recupero di peso, ma, contrariamente al primo studio, sono state notate differenze molto meno significative tra controlli e pazienti in fase acuta. Le analisi hanno confermato che il recupero di peso a breve termine sembra avere un impatto significativo sul metaboloma rispetto ai controlli e alla fase acuta di AN. Dopo recupero di peso a lungo termine il profilo metabolomico appariva più simile a quello dei controlli sani.

Tutti gli studi di cui sopra hanno analizzato campioni di plasma e di siero per ottenere informazioni sullo stato metabolico dei soggetti.

Prochazkova et al. [39] hanno studiato la composizione e la diversità del microbioma intestinale e hanno analizzato i livelli di neurotrasmettitori e acidi grassi a catena corta mediante SM e NMR

in campioni di feci di individui con AN prima e dopo il recupero di peso rispetto ai controlli sani. Le concentrazioni fecali di GABA e dopamina sono risultate diminuite nei soggetti con AN attivo mentre la serotonina era significativamente diminuita nei pazienti dopo il ripristino del peso rispetto ai controlli (risultava diminuita ma non significativamente anche nella fase attiva della malattia). I pazienti con AN attivo hanno mostrato livelli ridotti di butirrato che sono risultati aumentati dopo le terapie di recupero ponderale, mentre il propionato era significativamente diminuito nei pazienti dopo il trattamento. La concentrazione di acetato è risultata significativamente più bassa sia nell'AN attivo che nell'AN in remissione. Questi risultati sembrano suggerire che i livelli ridotti di acidi grassi a catena corta e neurotrasmettitori osservati negli individui con AN tendono a normalizzarsi con il recupero del peso.

Lo studio di Tomasova e colleghi [40] è stato condotto su campioni sia di siero sia di feci per valutare i cambiamenti metabolici causati dall'AN e l'effetto del ricovero sui livelli di questi metaboliti. Utilizzando la metabolomica *untargeted* hanno riscontrato nei soggetti con AN lo sviluppo di infiammazione e stress ossidativo (livelli aumentati di IL-17 sia nell'AN acuto che dopo il ricovero), livelli più bassi di tiroxina libera, livelli significativamente ridotti di glucosio, aumento dei livelli di piruvato e lattato, deficit di vitamine, distruzione di massa muscolare (aumento dei livelli di aminoacidi

fonte di substrati per la gluconeogenesi) e diminuzione dei corpi chetonici. Inoltre, gli autori hanno sottolineato da un lato un leggerissimo miglioramento dopo il trattamento e dall'altro una migliore prognosi dopo il trattamento nei pazienti con migliori parametri sistemici.

In conclusione, nonostante siano presenti in letteratura diversi studi condotti utilizzando un'approccio metabolomico per individuare marcatori di stato o di tratto dell'AN, i risultati risultano estremamente eterogenei e non concordi, anche a causa delle diverse metodiche applicate. Inoltre, solo pochi studi hanno esplorato il metaboloma fecale dei soggetti con AN e nessuno ha esaustivamente analizzato le relazioni tra metaboliti fecali e generi batterici del microbioma intestinale e le correlazioni con le caratteristiche psicopatologiche specifiche del disturbo.

1.4 Obiettivi dello studio

Il presente studio esplorativo, abbiamo analizzato i profili del microbioma fecale di soggetti con AN prima e dopo recupero ponderale e li abbiamo combinati con i loro profili metabolomici fecali (precedentemente caratterizzati) secondo un approccio multi-omico. Questi profili sono stati confrontati con quelli di un gruppo di controlli sani appaiati per sesso ed età. Abbiamo ipotizzato che nelle

pazienti con AN sia osservabile una disbiosi intestinale con una firma del microbioma differente rispetto sia alle pazienti con recupero ponderale sia ai controlli sani. Inoltre, abbiamo ipotizzato l'esistenza di sostanziali cambiamenti nei metaboliti fecali sia nell'AN in fase acuta sia dopo ripristino del peso rispetto ai controlli sani. Tuttavia, un risultato non sorprendente sarebbe stato quello di osservare cambiamenti nella composizione del microbioma fecale e/o nel metaboloma in fase acuta del disturbo e persistente anche dopo normalizzazione del peso, come biomarcatore di tratto dell'AN.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Partecipanti

Sono stati inclusi nello studio soggetti di sesso femminile che soddisfacevano i criteri del Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM-5) per la diagnosi di AN [1]. Criteri di esclusione per il gruppo dei pazienti erano:

- a) presenza di diarrea nell'ultimo mese;
- b) anamnesi positiva per celiachia, chirurgia del tratto gastrointestinale, malattie infiammatorie intestinale, tumori del tratto gastrointestinale, patologie caratterizzate da malassorbimento, trattamenti chemio o radioterapici;
- c) malattie croniche e/o disturbi endocrino-metabolici non correlati all'AN;
- d) trattamento con antibiotici negli ultimi 3 mesi;
- e) assunzione di probiotici, clisteri, lassativi o altri farmaci, compresi i farmaci psicotropi, negli ultimi due mesi.

È stato, inoltre, reclutato un gruppo di controlli sani, , rispondenti ai medesimi criteri di esclusione, con flussi mestruali regolari e buona salute fisica e mentale, come da esame obiettivo condotto e da Intervista Neuropsichiatrica Internazionale (M.I.N.I.) [41]. Nessuno soggetto incluso nel campione in studio assumeva terapia ormonale o contraccettivi orali.

I soggetti con AN sono stati sottoposti a un programma di trattamento ospedaliero di 20 settimane basato sulla riabilitazione nutrizionale con alimentazione assistita e la psicoterapia.

Ciascun partecipante forniva consenso informato scritto dopo chiari ed estensivi ragguagli sulla natura dello studio e le procedure utilizzate. Lo studio è stato condotto secondo i principi etici della dichiarazione di Helsinki e approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Salerno.

2.2 Valutazioni cliniche

La psicopatologia specifica dell'AN è stata valutata tramite la versione italiana dell'intervista validata Eating Disorder Examination (EDE) [42,43] mentre la psicopatologia generale veniva misurata mediante la versione italiana validata del Brief Symptom Inventory (BSI), che è una versione abbreviata della Symptom Checklist 90 [44,45]. L'EDE è un'intervista semi-strutturata che valuta la psicopatologia dei disturbi dell'alimentazione e che comprende quattro sottoscale (es. preoccupazioni per l'alimentazione, preoccupazioni per la forma, preoccupazioni per il peso) e un punteggio globale. La sua consistenza interna era del 0,91 nel campione del presente studio. Il BSI è una scala self-reported di 53 voci che fornisce un punteggio globale e 9 punteggi inerenti

altrettante sottoscale che valutano somatizzazione, sintomi ossessivo-compulsivi, sensibilità interpersonale, depressione, ansia, ostilità, ansia fobica, ideazione paranoica e psicoticismo. La coerenza interna del BSI era 0,96 nel campione in studio.

I soggetti con AN sono stati sottoposti alla somministrazione delle scale EDE e BSI all'inizio dello studio (T0) e immediatamente prima della dimissione (T1), 4-6 settimane dopo aver raggiunto la soglia del normale indice di massa corporea (IMC) di 18,5 kg/m².

2.3 Raccolta del campione fecale

Ai soggetti con AN è stato chiesto di raccogliere un campione fecale entro una settimana dall'ammissione nel reparto di degenza e prima dell'inizio del programma di trattamento specifico (T0) durante il periodo in cui veniva loro proposta una dieta standardizzata. La raccolta di un secondo campione di feci veniva proposta dopo il raggiungimento della soglia di IMC considerata normale, immediatamente prima della dimissione (T1). I controlli sani hanno raccolto il campione fecale una sola volta, dopo una settimana di dieta standardizzata.

I campioni di feci sono stati aliquotati in 2 fiale (1 fiala con soluzione *RNAlater*® e 1 senza soluzione) e immediatamente congelati a -80°C.

2.4 Dati dietetici

Al T0, i soggetti con AN ricevevano una dieta standardizzata da 1500 kcal/giorno con il 54,44% di carboidrati, 17,00% di proteine e 28,56% di lipidi per 5-7 giorni. Al T1, 9 pazienti assumevano una dieta da 2000 kcal/giorno (con 44,44% di carboidrati, 19,17% di proteine e 36,47% di lipidi) e 7 pazienti assumevano una dieta da 2250 kcal/giorno (con il 50,65% di carboidrati, il 19,15% di proteine e 30,26% di lipidi) per 7-10 giorni.

Nella settimana precedente la raccolta del campione fecale, i soggetti del gruppo di controllo assumevano una dieta standardizzata da 2000 kcal/giorno (con il 45% di carboidrati, il 18% di proteine e il 35% di lipidi).

2.5 Analisi del Microbioma

Il DNA totale è stato estratto da 0,25 g di campioni fecali, conservati e trasportati in *RNAlater*[®], con il kit di isolamento del DNA PowerSoil (Qiagen, Germantown, MD, USA). L'amplificazione della regione V4 del gene dell'RNA ribosomiale 16S è stata eseguita come già precedentemente descritto [46] utilizzando un sistema duale di codici a barre con fusione dei primer 515 F e 806 R. L'amplificazione è stata confermata mediante elettroforesi e i prodotti amplificati sono stati purificati con il kit di purificazione

Quiaquick PCR (Qiagen, Germantown, MD, USA). Infine, la concentrazione degli ampliconi è stata misurata utilizzando il kit Quant-IT Picogreen dsDNA Assay (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Gli ampliconi sono stati sequenziati con sistema Illumina MiSeq utilizzando il kit di sequenziamento a 500 cicli MiSeq v2.

2.6 Analisi Metabolomica

Il metaboloma fecale è stato estratto e purificato utilizzando il kit MetaboPrep GC (Theoreo srl, Montecorvino Pugliano, SA, Italia).

2.6.1 GasCromatografia-Spettrometria di Massa (CG-MS)

Campioni da 2 µl della soluzione derivatizzata sono stati iniettati nel sistema GC-MS (gascromatografo modello 2010 Plus accoppiato a uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo modello 2010 Plus; Shimadzu Corp., Kyoto, Giappone). La separazione cromatografica è stata ottenuta con una colonna capillare in silice fusa CP-Sil 8 CB da 30 m e 0,25 mm di diametro, con spessore del film pari a 1,00 µm (Agilent, J & W Scientific, Folsom, CA, USA), e come gas di trasporto (fase mobile) è stato utilizzato elio (He). La temperatura iniziale del forno di 100 ° C è stata mantenuta per 1 minuto e quindi aumentata di 6°C al minuto, per arrivare intorno ai 320°C con ulteriori 2,33 minuti di tempo di attesa. Il flusso di gas è stato impostato per ottenere una velocità lineare costante di 39 cm al secondo e il flusso

diviso è stato impostato a 1:5. Lo spettrometro di massa è stato impostato con ionizzazione a impatto elettronico (70 eV) in modalità di scansione completa nell'intervallo di 35-600 m/z con una velocità di scansione di 3333 amu/sec e un tempo dello sforzo di taglio del solvente di 4,5 minuti. La durata totale del protocollo GC-MS è di circa 40 minuti. I metaboliti non-target sono stati identificati comparando gli spettri di massa di ciascun picco con quelli presenti nella letteratura scientifica delle librerie del NIST14 (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Non tutti i segnali spettrometrici sono stati analizzati; alcuni degli oltre 250 segnali per campione prodotti dalla GC-MS non sono stati ulteriormente studiati perché non presenti in modo coerente in altri gruppi di campioni, o per concentrazioni troppo basse o, ancora, per scarsa qualità spettrale che non permette di identificarli o confermarli come metaboliti. Un totale di 224 metaboliti endogeni coinvolti nel metabolismo energetico, nel metabolismo dei lipidi e nel metabolismo degli aminoacidi è stato rilevato sequenzialmente. I dati cromatografici per l'analisi discriminante dei minimi quadrati parziali (PLS2-DA) sono stati tabulati con un campione per riga e una variabile (metabolita) per colonna. Le procedure di normalizzazione consistevano nella trasformazione e nel ridimensionamento dei dati. La trasformazione dei dati è stata effettuata mediante trasformazione logaritmica

generalizzata [$\log_2(x + \sqrt{x^2 + 1}) - \log_2 2$] sia per l'assenza di normalità sia per l'eteroscedasticità. Il ridimensionamento dei dati tramite autoridimensionamento (centrato sulla media e diviso per la deviazione standard di ciascuna variabile).

2.6.2 Controlli di qualità dell'analisi GC-MS

I campioni sono stati analizzati tal quali in triplicato e suddivisi in lotti da dieci. Secondo le istruzioni del kit MetaboPrep, ogni lotto è stato monitorato con tre controlli: un'iniezione in bianco (2 μ L di esano), un'iniezione di miscela standard (un mix di 15 molecole tra acidi organici, zuccheri, aminoacidi, steroli, acidi grassi e vitamine) e un'iniezione del campione (selezionato a caso tra i campioni del lotto). Ogni lotto è stato considerato valido se la soluzione in bianco non ha generato picchi rilevabili (Fig. S1A), il rapporto dell'area del picco standard era entro il 10% del valore previsto (Fig. S1B), il rapporto dell'area dei 100 picchi maggiori dell'iniezione del campione ripetuto era entro il 15% del campione originale (Fig. S1C). I cromatogrammi erano deconvoluti usando il frammento più intenso per tutti metaboliti che rispettavano i criteri di integrazione (Area > 10.000; Pendenza > 100/min; Larghezza > 1 sec). Per calcolare l'area del metabolita è stata utilizzata la modalità SIM (monitoraggio di singolo ione) dei cromatogrammi estratti. L'acido 2-iso-propil malico è stato utilizzato come standard interno (SIM =

147). L'annotazione tramite standard esterno dei metaboliti identificati utilizzando i valori VIP (importanza variabile nella proiezione) ha soddisfatto i requisiti per l'identificazione dei picchi.

2.7 Analisi Statistica

2.7.1 Dati demografici e clinici

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate mediante il software di statistica IBM SPSS 25 (IBM, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). La distribuzione normale dei dati è stata verificata utilizzando il Test Shapiro-Wilks. Poiché i dati erano normalmente distribuiti, le differenze tra i due gruppi sono state testate con analisi di varianza a una-via (ANOVA), seguita da *post hoc* test di Turkey. Il livello di significatività è stato considerato $p < 0.05$.

2.7.2 Analisi del Microbioma

Le letture sono state preelaborate utilizzando la pipeline MICCA (ver. 1.7.2) (<http://www.micca.org/>) [47]. Unità tassonomiche operazionali (OTU) sono stati assegnate raggruppando sulla base della loro sequenza di similarità. Le loro sequenze rappresentative sono state classificate utilizzando il classificatore RDP versione 2.12 sui dati di 16 S [48]. Il modello guidato dell'allineamento di sequenze multiple è stato eseguito usando PyNAST (ver. 1.2.2) [49] contro gli allineamenti multipli del database Greengenes [50]. L'albero

filogenetico è stato dedotto utilizzando micca-filogenesi [51]. L'eterogeneità del campione è stata ridotta tramite rarefazione. Le stime della diversità alfa (ricchezza all'interno del campione) e beta (dissomiglianza tra campione) sono state calcolate utilizzando il pacchetto phyloseq R [52]. Il test PERMANOVA, basato su 999 permutazioni, è stato effettuato utilizzando il pacchetto R vegan [53]. Le statistiche Welch t a due lati, non accoppiate sono state calcolate utilizzando la funzione *mt()* nella libreria phyloseq e i valori *p* sono stati aggiustati per confronti multipli che controllano il tasso di errore di tipo I familiare (minP procedura) [54]. I test di correlazione di Spearman sono stati calcolati utilizzando il pacchetto psych R [55]. L'analisi dell'*effect size* discriminante lineare (LEfSe) è stata eseguita per trovare i taxa rappresentati in modo differenziale tra i gruppi AN prima (T0) e dopo (T1) il ripristino del peso e controlli sani. LEfSe, che combina il test di KruskalWallis o il test della somma dei ranghi di Wilcoxon con l'analisi discriminante lineare (LDA), ordina le caratteristiche del microbiota in base all'effetto delle dimensioni. Più alta è la posizione di una caratteristica, maggiore è la differenza biologica. Per l'analisi LEfSe abbiamo assunto un valore $\alpha = 0,01$ e un punteggio LDA logaritmico soglia a 2,0 [56]. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando R [57] e i valori di *p* sono stati corretti tramite FDR [58].

2.7.3 *Analisi Metabolomica*

L'analisi di regressione ai minimi quadrati parziali (partial least square discriminant analysis - PLS-DA) [59] è stata eseguita utilizzando il pacchetto software statistico R 3.4.3 (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Il centraggio medio e il ridimensionamento della varianza unitaria sono stati applicati a tutte le analisi. La separazione di classe è stata ottenuta con l'analisi PLS-DA, un metodo supervisionato che utilizza tecniche di regressione multivariata per estrarre, tramite combinazioni lineari di variabili originali (X), le informazioni che possono prevedere l'appartenenza alla classe (Y). La regressione PLS è stata eseguita utilizzando la funzione `pls` presente nel pacchetto R `pls` [60]. La classificazione e la convalida incrociata sono state eseguite utilizzando la corrispondente funzione `wrapper`, sempre incluse nel pacchetto [61]. A seguire, è stato eseguito un test di permutazione per valutare il risultato della discriminazione di classe. È stato eseguito un test di permutazione per valutare il risultato della discriminazione di classe. In ogni permutazione, un modello PLS-DA è stato costruito tra i dati (X) e le etichette di classe permutate (Y) utilizzando un numero ottimale di componenti determinati dalla convalida incrociata per il modello, in base all'appartenenza di classe originale. Per valutare come generalizzare i risultati PLS-DA in un set di dati indipendente, una convalida incrociata leave-3-out è stata eseguita

[62]. Ogni ciclo di convalida incrociata comporta il partizionamento del campione di dati in due sottoinsiemi complementari. Il modello PLS2-DA è stato formato nel sottoinsieme più grande e convalidato nell'altro sottoinsieme, composto da tre campioni selezionati casualmente. Per ridurre la variabilità, sono stati eseguiti più cicli di convalida incrociata fino a quando tutti i modi possibili per dividere il campione originale in un training e un set di validazione sono stati esplorati. I risultati della convalida sono stati combinati nei round per fornire una stima della performance predittiva del modello. L'algoritmo metacost [63] è stato utilizzato per la classe gestione degli squilibri. La matrice dei costi è stata costruita secondo la dimensione di classe. I percorsi metabolici sono stati costruiti utilizzando l'applicazione MetScape [64] del software Cytoscape [65].

2.7.4 Selezione dei metaboliti rilevanti

Le tecnologie ad alto rendimento applicate all'analisi metabolomica *untargeted* consentono la misurazione simultanea di centinaia di metaboliti in un campione biologico. Per cui, non tutte le informazioni ottenute risultano rilevanti per la specifica condizione studiata. La selezione dei metaboliti si è dimostrata efficace nel migliorare l'accuratezza predittiva di molti classificatori, talvolta raggiungendo un'accuratezza predittiva quasi perfetta per set di test indipendenti [66-68]. Inoltre, modelli di classificazione costruiti su

piccoli sottoinsiemi di metaboliti sono spesso più semplici e facili da interpretare rispetto a quelli costruiti su una serie completa di informazioni. Partendo da queste considerazioni, nel presente studio è stata semplificata l'analisi selezionando i metaboliti tramite tre diverse strategie di selezione: VIP, Volcano Plot e una selezione basata su algoritmi genetici.

VIP: Il punteggio VIP è stato calcolato per ciascun metabolita. Il punteggio VIP è una somma ponderata dei quadrati dei carichi PLS, tenendo conto della quantità di variazione Y spiegata in ciascuna dimensione. Il punteggio VIP, in sintesi, è espressione del grado di differenziamento di un metabolita rispetto ad un altro. I metaboliti con un punteggio VIP superiore a 1,5 sono stati ulteriormente confermati con uno standard analitico indipendente come riportato nell'Iniziativa Metabolomica Standard (livello MSI = 1).

Volcano plot: La concentrazione dei metaboliti è stata anche studiata tramite grafico *volcano plot*. Nello specifico, il *volcano plot* si costruisce plottando il logaritmo (di solito in base 10) del *p-value* cambiato di segno sull'asse *y*. Più una variabile si allontana dall'origine lungo l'asse *y*, maggiore è il suo livello di significatività. Sull'asse *x* si rappresenta invece il logaritmo (in base 2) del *fold change* per una determinata variabile (il *fold change* è il rapporto tra le medie campionarie dei due gruppi). Il logaritmo del *fold change* viene utilizzato in modo che cambiamenti in entrambe le direzioni

appaiano equidistanti dal centro. Plottando i punti in questo modo si ottengono due regioni di interesse nel *plot*: quei punti che si trovano nella parte superiore che sono o molto a sinistra o molto a destra. Questi rappresentano valori che mostrano una grande magnitudine di *fold change* (essendo a sinistra o a destra del centro) nonché un'elevata significatività statistica (essendo verso la parte alta). Il valore p è stato calcolato aggiustando il valore alfa ($\alpha < 0,05$) per il numero di componenti dell'analisi delle componenti principali (PCA) spiegando il 95% della varianza totale [69, 70]. Sono stati utilizzati $fold\ change \geq 2$ o ≤ -2 come valori limite.

Selezione dei metaboliti basata su algoritmo genetico: Un algoritmo genetico mima le forze darwiniane di selezione naturale per ottimizzare i valori di una funzione [71]. È stata costruita una prima serie di potenziali soluzioni e sono stati calcolati i corrispondenti valori di "*fitness*". Usando un'analogia evolutiva, ogni soluzione rappresenta un individuo e l'intero insieme è stato considerato come una popolazione. Gli individui con i migliori valori di fitness erano combinati casualmente per produrre una prole che strutturerà la popolazione successiva. Per fare ciò, gli individui venivano selezionati e sottoposti a crossover (mimando la riproduzione genetica) e sono stati anche sottoposti a mutazioni casuali. Questo processo è stato ripetuto più volte producendo molte generazioni che hanno creato soluzioni sempre migliori. Per la

selezione dei metaboliti, gli individui erano sottoinsiemi di predittori codificati come binari; i metaboliti erano inclusi o meno nel sottoinsieme. I valori di fitness erano la misura della performance del modello. L'algoritmo genetico è stato creato utilizzando RapidMiner 8.3 (RapidMiner, Boston, MA).

2.7.5 Integrazione Microbioma - Metaboloma

Le mappe di calore di correlazione multiomica sono state create calcolando i coefficienti di correlazione di Spearman per ciascuna combinazione di abbondanza di genere microbico e intensità dei metaboliti utilizzando la funzione "corr.test" nel pacchetto R "psych" [72].

3. RISULTATI

3.1 Dati clinici e demografici

Le caratteristiche demografiche, antropometriche e psichiatriche dei controlli sani e delle pazienti AN all'arruolamento (T0) e dopo il ripristino del peso corporeo (T1) sono riportate nella Tabella 3.

Ventiquattro soggetti di sesso femminile con diagnosi di AN (età 21.6 ± 4.2 anni), e 20 soggetti sani (età 23.0 ± 3.2 anni) costituivano il campione per lo studio. Sei pazienti presentavano un sottotipo *binge-purging* di AN, le restati 18 appartenevano al sottotipo *restrittivo*. Al momento dell'arruolamento, i soggetti con AN mostravano un IMC inferiore rispetto ai controlli ($14,9 \pm 1,7$ Vs $20,3 \pm 1,4$ [Kg / m²], $p < 0,05$). In seguito al percorso di riabilitazione nutrizionale, l'IMC delle pazienti è risultato essere significativamente aumentato ($20,3 \pm 1,3$, $p < 0,05$) rispetto al T0 e non statisticamente distinguibile dall'IMC dei controlli. Gli indicatori psicopatologici, misurati tramite EDE-Q, BDI o l'incidenza di depressione maggiore erano significativamente più alti nelle pazienti con AN al T0 rispetto al T1, pur rimanendo significativamente più alti di quelli dei controlli sani (Tab.1).

3.2 Microbioma

L'alfa-diversità misurata sia dall'indice Chao (Fig. 1A1) che dall'indice di Fisher (Fig. 1A2) ha mostrato valori significativamente ridotti nelle pazienti con AN al T0 rispetto ai controlli sani; tale significatività scompariva nelle pazienti dopo ripristino del peso (T1). Una tendenza crescente degli indici di diversità alfa è stata evidenziata nelle pazienti in fase acuta rispetto a quelli con peso recuperato e ai soggetti del gruppo di controllo. Coerentemente, la diversità beta, riportata in termini di scaling multidimensionale non metrico, ha mostrato una distribuzione continua con un andamento crescente da pazienti con AN al T0 alle pazienti con AN al T1 e ai controlli sani, anche se non sono emerse differenze statisticamente significative tra i gruppi (Fig. 1B2). Le quantità di batteri sono riportati in Fig. 1 C1-C5. A livello di phylum, sebbene Firmicutes e Bacteroidetes siano risultati i taxa più abbondanti in tutti i gruppi, nelle pazienti con AN sia al T0 sia al T1 erano, rispettivamente, inferiori e superiori a quelli dei controlli. Il rapporto dell'abbondanza Bacteroidetes-Firmicutes (Fig. 1B1) era significativamente più alto nei pazienti con AN sia a T0 ($1,36 \pm 1,45$ vs $0,67 \pm 0,42$, $p = 0,046$) che al T1 ($1,09 \pm 0,79$ vs $0,67 \pm 0,42$, $p < 0,05$). L'analisi LEfSe ha rivelato che, rispetto ai controlli sani, le pazienti con AN al T0 presentavano un aumento significativo delle abbondanze relative di phylum/classe di Actinobacteria e dei generi Weissella e Copococcus, nonché una

significativa diminuzione delle abbondanze relative dell'ordine Coriobacteriales, del genere Parabacteroides e della famiglia delle Oxalobacteraceae (Fig. 2A). Dopo il ripristino del peso, le pazienti con AN hanno mostrato un aumento significativo dell'abbondanza relativa della famiglia Leuconostocaceae e un notevole decremento della relativa abbondanza del phylum/classe di Actinobacteria, dell'ordine Coriobacteriales, della famiglia Catabacteriaceae e dei generi Collinsella, Parabacteroides e Catabacter rispetto ai controlli sani (Fig. 2B).

3.3 Metaboloma

Come mostrato in Fig. 3a, i grafici dello score PLS2-DA sono chiaramente differenziati tra pazienti con AN in fase acuta, pazienti con recupero ponderale e i controlli sani, senza nessuna sovrapposizione (Fig. 3b). La performance PLS2-DA, valutata mediante cross validation e test di permutazione, non ha mostrato overfitting ($Q^2 = 0,897$, $R^2 = 0,941$, Accuratezza = 0,996, $p < 0,0005$) (Fig. 3c). Il modello con sei componenti (Fig. 3d), ha identificato 14 metaboliti con un VIP > 1,5 (Fig. 3e): cadaverina, cicloserina, N-acetil etilendiammina, stearico acido, coprostanolo o coprosterolo, acido propionico, acido linoleico, acido lattico, acido 3-metil,2-chetobutirrico, 2-cheto,3-acido metilvalerico, fucosio, xilosio,

ramnosio e arabinosio. Questi metaboliti sono stati usati per costruire un PCA il cui il grafico dei punteggi mostrava chiaramente una separazione dei gruppi coerente con i risultati del PLS2-DA. L'analisi del pathway metabolico dei metaboliti selezionati tramite VIP è stata riassunta nella mappa dei sistemi metabolici (Fig. S2). È stata evidenziata un'interazione precisa di diversi pathways coinvolti: degradazione di valina, leucina e isoleucina; glicolisi e gluconeogenesi; metabolismo di metionina e cisteina; metabolismo del ciclo dell'urea; metabolismo del fruttosio e del mannosio; metabolismo degli acidi grassi de novo; metabolismo dell'acido butirrico; metabolismo di glicina, serina, alanina e treonina e metabolismo del linoleato.

La PCA sui soggetti con AN in fase acuta e sui controlli ha mostrato che le prime 35 componenti spiegavano il 95% della varianza totale, mentre la PCA sui soggetti con AN dopo recupero ponderale e sui controlli sani ha mostrato che il 95% della varianza totale era spiegata dai primi 29 componenti. Il Volcano plot utilizzando la correzione Bonferroni basata sulla PCA, ($p = 0,05/35 = 0,0014$), ha mostrato che, nei soggetti con AN al T0, i livelli di coprosterolo, cicloserina, acido valerico, acido stearico, metilgalattoside, acido 3-metil,2-chetobutirrico, acido propionico, acido linolenico e acido laurico erano significativamente superiori rispetto ai controlli sani mentre i livelli di xilosio, fucosio e ramnosio erano

significativamente ridotti (Fig. 4a e Tabella 4). Dopo il ripristino del peso ($p = 0,05/29 = 0,0017$), le concentrazioni fecali di acido valerico, acido idrossistearico, e l'acido 3-metil,2-chetobutirrico erano significativamente più alte rispetto ai controlli sani mentre i livelli fecali di acido butirrico, piperina, meso-eritritolo-1 e fenilalanina risultavano significativamente inferiori rispetto ai controlli sani (Fig. 4b e Tabella 4). La *heatmap* dei metaboliti fecali delle pazienti al T0 e al T1 selezionati tramite GA comparati con quelli dei controlli sani mostra due distinte classi separate: una classe con aumento dei metaboliti nelle pazienti con AN al T0 e un'altra con aumento nelle pazienti con AN al T1. I primi erano rappresentati soprattutto dagli aminoacidi e dagli acidi organici, mentre i secondi dagli zuccheri. I metaboliti selezionati mediante GA risultavano correlati con i punteggi di BSI ed EDE. Le risultanti *heatmaps* sono mostrate nelle Fig. 5 e 6.

3.4 Integrazione Microbioma - Metaboloma

Sono stati usati 49 metaboliti rilevanti, selezionati mediante un algoritmo genetico specificamente disegnato. Tali metaboliti si raggruppavano in tre differenti cluster (Fig. 7): uno con una più bassa concentrazione nel gruppo di controllo, prevalentemente composti da coprosterolo, grassi, acidi grassi e acidi grassi batterici a

catena piccola, uno con una più bassa concentrazione nel campione AN-T0, che comprende principalmente zuccheri e metaboliti derivati dagli zuccheri, e uno con una più bassa concentrazione nel gruppo AN-T1, in gran parte composto da aminoacidi e metaboliti derivati dal microbiota intestinale. I coefficienti di correlazione delle relazioni tra metaboliti e generi di batteri hanno mostrato strutture diverse tra i soggetti sani e i pazienti con AN in fase acuta e dopo recupero ponderale (Fig. 8). In particolare, i soggetti sani hanno mostrato una complessa rete di relazioni tra batteri e metaboliti come mostrato dai nodi di diversi raggruppamenti per entrambe le caratteristiche. Le pazienti con AN al T0, invece, hanno mostrato un contesto molto semplice rappresentato da un minor numero di nodi di clustering principali mentre al T1 hanno mostrato una situazione intermedia. Inoltre, il 21,4% delle 2754 correlazioni analizzate è risultato positivo nel gruppo AN-T0 e negativo sia nel gruppo AN-T1 sia nel gruppo di controllo e viceversa.

3.5 Microbioma e caratteristiche cliniche

La Fig. 9 mostra le correlazioni tra i generi microbici individuati e l'IMC delle pazienti, la psicopatologia generale e specifica. Riassumendo, le correlazioni più significative sono risultate: 1) nei pazienti con AN al T0 i generi Copococcus, Clostridium_IV,

Roseburia, Termsporobacter sono risultati correlati positivamente con i punteggi BSI e negativamente con i punteggi dell'EDE; Bifidobacterium ed Enterococcus sono risultati positivamente correlati ai punteggi dell'EDE; Ruminococcus 2, Gemmiger Lachnospiracea incertae sedis e Butyrroicoccus sono risultati negativamente correlazioni con i punteggi di BSI ed EDE; il Clostridium_XVIII era correlato negativamente con l'IMC; 2) nelle pazienti con AN al T1 Copococcus, Roseburia e Paraprevotella hanno mostrato forti correlazioni positive con i punteggi di BSI mentre Copococcus, Parabacteroides, Gemmiger, Intestinobacter e Termsporobacter sono risultati correlati negativamente con i punteggi all'EDE; Parasutterella, Acidoaminococcus, Bilophila, Turicibacter, Not_Assigned e Clostridium_Sensu_Strictu risultavano negativamente correlati con l'IMC; 3) nei controlli sani Ruminococcus e Gemmiger sono risultati positivamente correlati con i punteggi di BSI mentre il Clostridium_IV era correlato negativamente con i punteggi sia di BSI sia dell'EDE, il Flavonifactor era correlato negativamente ai punteggi dell'EDE; Eggerthella, Coprobacter e Clostridium XIVa erano correlati negativamente con l'IMC mentre Parabacteroides era positivamente correlato con l'IMC.

4. DISCUSSIONE

Nel presente studio sono stati analizzati i profili del microbioma fecale di donne con AN prima e dopo recupero ponderale e sono stati esplorati, tramite procedura metabolomica *untargeted*, le concentrazioni di 224 diversi metaboliti fecali, comparandoli con quelli di un gruppo di controlli sani. Inoltre, sono state integrati i risultati delle analisi del microbioma e del metaboloma, in linea con un approccio multi-omico.

In accordo con studi precedenti [16,22], nel presente studio è stata evidenziata una diminuzione della ricchezza batterica intra-individuale (diversità alfa) nelle pazienti con AN in fase acuta. Inoltre, sebbene nei soggetti con AN in studio la diversità alfa ha presentato una tendenza all'aumento con il ripristino del peso, questa non si è completamente normalizzata, risultando ancora significativamente inferiore rispetto ai controlli sani. Questo risultato è coerente con lo studio di Kleinman et al. [16], ma in disaccordo con Mack et al. [18], che riportava un aumento della diversità alfa nelle donne con AN con parziale recupero di peso misurato tramite l'indice Shannon, una metrica che pesa il numero di specie in base ai loro dati di uguaglianza relativa e non dalla loro ricchezza come invece fanno gli indici Chao e Fisher. Le differenze nelle caratteristiche cliniche, nella numerosità campionaria e nelle

misurazioni degli indici possono spiegare tale discrepanza. Per quanto concerne le differenze nella composizione interindividuale del microbioma intestinale, in questo studio sono stati rilevati valori di diversità beta paragonabili a quelli dei controlli normali sia nei pazienti con AN sottopeso che in quelli con peso ripristinato. Tale risultato è in accordo con quanto precedentemente riportato in letteratura [19].

A livello tassonomico, nel presente studio è stata evidenziata una diminuzione relativa dell'abbondanza di Firmicutes e una maggiore abbondanza relativa di Bacteroidetes nei soggetti con AN al T0 con una tendenza alla parziale normalizzazione dopo recupero del peso. Il rapporto Bacteroidetes-Firmicutes negli individui con AN è risultato significativamente più alto rispetto ai controlli sia al T0 sia al T1. In linea con tali dati, Borgo et al. [19] hanno riportato una diminuzione dell'abbondanza relativa di Firmicutes in un campione di donne con AN sottopeso. Invece, Mack et al. [18] evidenziavano che l'abbondanza relativa di Bacteroidetes era significativamente più bassa nei pazienti con AN sottopeso e che diminuiva ulteriormente dopo l'aumento di peso, mentre l'abbondanza relativa di Firmicutes nei pazienti con AN era superiore a quella dei controlli sani solo dopo l'aumento di peso. Nessuna differenza significativa nelle abbondanze relative di entrambi i phyla è stata rilevata tra pazienti con AN in fase acuta di malattia e controlli da Amougom et al. [20].

Nei soggetti con AN del campione in studio, la maggiore abbondanza relativa di Bacteroidetes potrebbe essere correlata alla composizione dei macronutrienti della dieta, poiché è stato precedentemente dimostrato che la perdita di peso tramite regimi dietetici poveri in carboidrati e grassi (come tipicamente accade nel caso dei soggetti con AN) aumenta i livelli di Bacteroidetes [73].

L'abbondanza relativa del phylum/classe Actinobacteria è risultato significativamente aumentato nelle pazienti con AN al T0 ma significativamente diminuiti al T1, rispetto ai controlli sani. Una maggiore abbondanza relativa di Actinobacteria è stata precedentemente segnalata da Mack et al. [18] nelle pazienti con AN sia prima sia dopo l'aumento di peso. La discrepanza di tali risultati nelle pazienti con AN dopo ripristino del peso potrebbe essere correlata al diverso grado di ripristino di peso considerato, poiché i pazienti del presente studio avevano tutte raggiunto la soglia di normalità dell'IMC mentre nello studio di Mack et al. L'IMC medio alla dimissione dei pazienti era ancora al di sotto del valore di peso normale. In questa linea tassonomica, l'abbondanza relativa dell'ordine Coriobacteriales era inferiore rispetto ai controlli sia nei soggetti con AN sottopeso sia dopo recupero ponderale e, in questo ultimo gruppo, anche l'abbondanza relativa del genere Collinsella è risultata ridotta. Pertanto, sembra che sia il genere Collinsella sia l'ordine Coriobacteriales abbiano contribuito alla diminuzione

dell'abbondanza relativa del phylum/classe di Actinobacteria, come osservato al T1. A livello di genere, nelle pazienti con AN al T0 è stata mostrata una riduzione nell'abbondanza relativa di Parabacterioides e una maggiore abbondanza relativa di Copococcus e Weissella, mentre al T1 è stata evidenziata una diminuzione delle abbondanze relative di Parabacteroides, Catabacter e Collinsella. Pertanto, sembra che i cambiamenti nelle abbondanze relative dell'ordine Coriobacteriales e del genere Parabacteroides nell'AN possano essere indipendenti dalle variazioni di peso dei pazienti, poiché sono risultate diminuite sia in fase di sottopeso che dopo recupero ponderale, suggerendo che fattori diversi dallo stato nutrizionale potrebbero contribuire alle loro alterazioni. Dall'altra parte, invece, nessuno di questi taxa è risultato associato all'IMC sia al T0 sia al T1. Ulteriori studi si rendono necessari per investigare se tali cambiamenti nella composizione del microbioma fecale possano rappresentare un possibile marcatore di tratto dell'AN.

Per quanto concerne l'analisi metabolomica, come ipotizzato in premessa, è stato riscontrato che le concentrazioni di alcuni metaboliti fecali differivano nelle pazienti con AN sia in fase acuta sia dopo ripristino del peso. In particolare, i risultati hanno mostrato che un modello PLS2-DA con 14 metaboliti fecali con un punteggio VIP superiore a 1,5 era capace di differenziare chiaramente tra i soggetti con AN prima e dopo recupero ponderale e i controlli sani,

senza sovrapposizioni tra i tre gruppi. L'analisi del pathway metabolico dei metaboliti selezionati mediante VIP hanno identificato chiaramente 9 pathways metabolici potenzialmente alterate nell'AN; questi pathways metabolici riguardano principalmente il metabolismo dello zucchero, degli aminoacidi e degli acidi grassi con diversi punti di interazione, il che conferma una rilevante disregolazione del metabolismo endogeno in questo disturbo. L'analisi con Volcano plot, confrontando le concentrazioni dei 224 metaboliti fecali tra pazienti con AN in fase acuta e dopo ripristino del peso corporeo con il gruppo di controlli sani, ha mostrato che: (1) le concentrazioni fecali di acido valerico e acido 3-metil,2- chetobutirrico sono risultati aumentati sia al T0 che al T1; (2) le concentrazioni fecali di acido propionico, acido stearico, acido linolenico, metil-galattoside, coprosterolo (o coprostanolo), cicloserina e acido laurico sono risultate aumentate al T0 mentre si normalizzavano al T1; (3) i livelli fecali di fucosio, xilosio e ramnosio, sono risultati ridotti al T0 e normalizzati al T1; (4) i livelli fecali di piperina, fenilalanina, acido butirrico e il meso-eritritolo-1 erano diminuiti mentre i livelli fecali di acido idrossistearico erano aumentati al T1 ma normali al T0. Tutte queste modifiche evidenziano peculiari profili metabolomici fecali nei soggetti con AN in fase acuta e dopo recupero del peso a breve termine, con potenziale valore di biomarker di alcuni cambiamenti di metaboliti

rilevati. Si sottolinea come nel presente studio siano stati utilizzate tre strategie separate di selezione dei metaboliti con differenti approcci statistici. In particolare, il Volcano plot seleziona i metaboliti in termini di differenze di concentrazione. Il punteggio VIP seleziona i metaboliti con la più alta importanza nella separazione del gruppo, indipendentemente dalle loro differenze di concentrazione [74]. GA seleziona un sottoinsieme di metaboliti in grado di guidare un modello di classificazione con prestazioni di classificazione simili a quelle ottenibili tramite un modello costruito sull'intero set di metaboliti. I metaboliti selezionati da più di un approccio possono essere considerati più rilevanti rispetto a metaboliti selezionati tramite un solo criterio. Per esempio, zuccheri (xiloso, fucosio e ramnosio), l'acido grasso stearico e il coprosterolo sono stati considerati rilevanti da tutti e tre i criteri di selezione in studio (Tabella 2).

I 224 metaboliti fecali esplorati nel presente studio tramite approccio metabolomico *untargeted* possono provenire dall'ospite e/o dai simbionti microbici. Pertanto, i cambiamenti osservati nelle pazienti con AN possono essere il risultato della cattiva nutrizione quantitativa e/o qualitativa, che caratterizza la fase acuta di AN, o può essere conseguenza delle alterazioni della composizione del microbioma intestinale [75]. In effetti, il metabolismo dei soggetti con AN si basa su fonti di energia diverse da quelle di individui sani,

poiché i pazienti AN in genere evitano di assumere cibi ricchi di zucchero e/o di grassi. Questo potrebbe spiegare, almeno in parte, le ridotte concentrazioni di zuccheri riscontrate nelle pazienti al T0 e la loro normalizzazione dopo T1 e quindi il ripristino di una dieta normale. Inoltre, nelle pazienti in fase acuta le concentrazioni di ramnosio e xilosio fecali erano correlate negativamente con le preoccupazioni per peso e forma fisica all'EDE, il che corrobora la spiegazione proposta.

Sebbene l'analisi dei dati della metabolomica fecale sia difficile perché una serie di variabili contribuisce alla presenza di metaboliti nei campioni di feci, alcuni cambiamenti dei metaboliti osservati meritano un'adeguata discussione, dal momento che potrebbero essere potenzialmente importanti per la fisiopatologia dell'AN. L'acido propionico è un acido grasso a catena corta presente nel tratto gastrointestinale dell'uomo e di altri mammiferi come prodotto finale della digestione microbica dei carboidrati. In contrasto con i risultati del presente studio, che mostrano un aumento dei livelli di acido propionico fecale sia nelle pazienti con AN in fase acuta sia in quelle con ripristino del peso corporeo, due gruppi di ricerca indipendenti hanno precedentemente pubblicato i propri risultati in cui si osservava una diminuzione delle concentrazioni fecali di acido propionico in pazienti con AN in fase acuta AN [19,21]. Una deplezione delle specie microbiche *Roseburia inulinivorans* [21] è

stata associata a una diminuzione del propionato fecale nell'AN, poiché tale specie microbica produce propionato fecale a partire dal fucosio [76].

Anche l'acido valerico e l'acido butirrico appartengono alla famiglia degli SCFA, e sono associati alla fermentazione batterica nell'intestino. A differenza dei risultati di questo studio, nelle feci dei pazienti con AN in fase acuta sono state riscontrate normali concentrazioni di acido valerico [19,21] mentre i livelli di acido butirrico sono stati riportati stato riportati sia invariato [21] sia diminuiti e negativamente correlati con i punteggi di depressione e ansia [19]. Nel campione in studio, i livelli di acido valerico sono risultati aumentati sia nei pazienti in fase acuta sia in quelli con ripristino del peso, mentre le concentrazioni di acido butirrico sono risultate diminuite nelle pazienti dopo ripristino di peso, il che suggerisce un ruolo da marcatori di tratto per tali metaboliti. Inoltre, un possibile ruolo per questi metaboliti nella fisiopatologia dell'AN può essere anche suggerito tenendo conto di precedenti osservazioni che riportavano per l'acido butirrico effetti nei topi simili agli antidepressivi [77] mentre l'acido valerico appare simile nella struttura all'acido 4-idrossibutirrico (GHB), che è un neurotrasmettitore naturale precursore del GABA, il principale neurotrasmettitore inibitorio del SNC, probabilmente coinvolto nella patogenesi di diversi disturbi psichiatrici.

La cicloserina è un analogo dell'amminoacido D-alanina e un modulatore agonista del recettore N-metil-D-aspartato, che facilita l'apprendimento aumentando la funzione glutammatergica. È stato dimostrato che migliora l'apprendimento comportamentale nella terapia di esposizione facilitando così l'estinzione dei timori che è l'obiettivo perseguito di questo tipo di trattamento [78,79]. Infatti, uno studio controllato con placebo ha dimostrato che la somministrazione di cicloserina in pazienti con AN in fase acuta facilitava la terapia di esposizione favorendo l'aumento dell'IMC [80]. Quindi, l'aumento delle concentrazioni di cicloserina intestinale rilevate nel gruppo delle pazienti al T0 può essere vantaggioso per questo tipo di trattamento.

L'acido linolenico è un acido grasso polinsaturo (PUFA) membro del gruppo degli acidi grassi essenziali noti come acidi grassi omega-3, essenziali nell'alimentazione di tutti mammiferi, che altrimenti non sono in grado di sintetizzarli. Le fonti primarie di PUFA alimentari sono rappresentate da cibi ricchi di grassi. È noto che i soggetti con AN evitano alimenti ricchi in grassi e presentano livelli ematici alterati di PUFA [81,82]. L'integrazione di PUFA è stata proposta come trattamento aggiuntivo nell'AN [83]. Tuttavia, l'aumento dei livelli fecali di acido linolenico osservato nello studio nei soggetti con AN in fase acuta non può essere semplicemente spiegato dai cambiamenti nell'introito alimentare ma piuttosto

potrebbe rappresentare il risultato di disturbi specifici sconosciuti nel pathway metabolico dei PUFA. Coerentemente con tali risultati, un recente studio [15] riportava livelli aumentati di acido linolenico nei soggetti con AN in fase acuta ma non nei soggetti guariti rispetto ai controlli sani.

Le concentrazioni aumentate di coprosterolo fecale (o coprostanolo) osservate nei soggetti con AN sottopeso potrebbero essere l'esito di un aumento dei livelli sierici di colesterolo che tipicamente si verifica nella fase acuta dell'AN [84], poiché il coprosterolo è un derivato dalla bioidrogenazione del colesterolo nell'intestino probabilmente per intervento della flora batterica.

Le analisi delle relazioni tra i 49 metaboliti fecali selezionati e i generi di batteri hanno mostrato strutture diverse tra i 3 gruppi. Infatti, rispetto ai controlli sani, i quali mostravano una complessa rete di relazioni, i pazienti al T0 mostravano una rete di relazioni relativamente semplice con pochi nodi di clustering mentre al T1 la situazione si mostrava intermedia tra le due condizioni. Ancora più importante, nei pazienti con AN quasi un quarto di quelle correlazioni erano di segno negativo al T0 e positivo, come nel gruppo di controllo, al T1. Inoltre, il 47% e il 55% delle correlazioni microbioma/metaboloma hanno avuto un segno negativo nei pazienti AN dopo recupero ponderale e nei controlli sani, rispettivamente, mentre nei pazienti con AN in fase acuta di malattia

il 70% di queste correlazioni ha mostrato un segno negativo, il che suggerisce un consumo prevalente di metaboliti da parte del microbioma intestinale rispetto alla produzione di metaboliti. Questi dati non solo indicano una profonda perturbazione del microbioma intestinale e dell'interazione dei metaboliti fecali nei pazienti con AN in fase acuta, ma suggeriscono anche che almeno una parte della flora batterica probabilmente inverte il proprio trend metabolico nella condizione di sottopeso. Precedenti studi hanno esplorato la composizione del microbioma intestinale e le concentrazioni fecali di SCFA, come propionato, valerato, butirrato e/o acidi grassi a catena ramificata (BCFA), come isovalerato e isobutirrato nei pazienti con AN e, sebbene i risultati non siano concordi tra i diversi gruppi di ricerca, hanno suggerito possibili collegamenti tra le alterazioni nel microbioma intestinale e i cambiamenti nei prodotti finali della fermentazione dei carboidrati (SCFA) e delle proteine (BCFA) da parte dei batteri intestinali [18,19,21]. Per quanto ne sappiamo, qui riportiamo per la prima volta un'ampia rete di interazione tra microbiota intestinale e metaboliti fecali in soggetti con AN in relazione al loro stato nutrizionale. Resta da stabilire l'utilità di tali risultati nello studio della fisiopatologia dell'AN.

Le *heatmaps* delle correlazioni tra generi batterici e la psicopatologia dell'AN hanno mostrato diverse relazioni significative di cui, tuttavia, l'importanza fisiopatologica è tutt'altro

che chiara. Nonostante tale incertezza, vale la pena ricordare che alcune correlazioni erano presenti nelle pazienti con AN sia al T0 che al T1, altre solo solo a T0 ma non a T1 e viceversa e, soprattutto, alcune altre presentavano segni divergenti tra pazienti e controlli sani. Globalmente, è evidente che le *heatmaps* delle pazienti con AN al T0 erano drasticamente diverse da quelle dei controlli sani mentre quelle delle pazienti con AN in T1 risultavano più simili a quelle dei controlli sani, suggerendo un trend di normalizzazione parallela al recupero del peso corporeo.

Considerando, invece, l'analisi delle correlazioni tra metaboliti fecali e psicopatologia specifica del disturbo, sono emerse come significative le correlazioni con caratteristiche quali l'ostilità, i sintomi paranoici e la sensibilità interpersonale. Di nuovo, sebbene il significato di tali correlazioni non sia chiaro, non è possibile escludere che i cambiamenti dei metaboliti possano assumere un significato fisiopatologico rappresentando il segno biologico di processi che, direttamente o indirettamente, favoriscono la comparsa e/o il mantenimento di alcuni aspetti della psicopatologia dei disturbi dell'alimentazione, poiché la maggior parte dei cambiamenti rilevati persistono e/o compaiono anche nei soggetti con AN dopo ripristino di peso a breve termine.

Lo studio presenta punti di forza e limiti. Innanzitutto, è il primo studio che ha valutato prospetticamente i profili metabolomici fecali di donne con AN prima e dopo il ripristino del peso trattate con un programma nutrizionale che consente di valutare la composizione della dieta nella fase di recupero ponderale. In secondo luogo, la psicopatologia del disturbo alimentare è stata valutata con il *gold standard* tra le misure della psicopatologia specifica dei disturbi dell'alimentazione.

Lo studio presenta due limiti principali. In primo luogo, le pazienti con recupero ponderale avevano raggiunto un IMC normale solo da 4 - 6 settimane, e questo potrebbe non rappresentare un recupero di peso stabile. Pertanto, sarebbero necessari ulteriori studi che prendano in considerazione criteri che permettano di valutare un recupero ponderale più duraturo e stabile. Secondo, il numero di soggetti arruolati era relativamente piccolo e non tutte le pazienti sono state valutate ai due tempi dello studio. Tuttavia, questo appare un limite relativamente comune negli studi su pazienti con AN disegnati per effettuare valutazioni al baseline e dopo remissione. Inoltre, il disegno longitudinale dello studio ci consente certamente di rafforzare l'affidabilità dei risultati ottenuti.

5. CONCLUSIONI

I risultati di questo studio mostrano l'esistenza di una profonda perturbazione nella composizione microbioma intestinale e nel metaboloma fecale in pazienti con AN in fase acuta di malattia che non si sono normalizzati dopo ripristino del peso a breve termine. Queste osservazioni, sebbene divergente da alcuni precedenti dati presentati in letteratura, confermano la presenza di disbiosi intestinale nell'AN sia durante la fase di malnutrizione sia dopo remissione a breve termine. Inoltre, per la prima volta, è stato evidenziato che nei pazienti con AN i batteri intestinali sono significativamente collegati con diversi metaboliti fecali in modo diverso rispetto a quanto accade nei controlli normali e che alcune di queste relazioni hanno una direzione divergente nella fase acuta del disturbo rispetto alla fase di ripristino del peso corporeo. Questi dati, sebbene difficili da interpretare in relazione al loro significato fisiopatologico, suggeriscono la necessità di ulteriori studi volti a indagare se la correzione della disbiosi intestinale e del dismetabolismo possa avere effetti terapeutici e se i cambiamenti metabolomici possano assumere significato di biomarcatore diagnostico e/o fisiopatologico di stato o di tratto dell'AN.

6. BIBLIOGRAFIA

01. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association; 2013. Monteleone P, Castaldo E, Maj M. Neuroendocrine dysregulation of food intake in eating disorders. *Regul Pept* 2008;149:39-50.
02. Monteleone P, Castaldo E, Maj M. Neuroendocrine dysregulation of food intake in eating disorders. *Regul Pept* 2008;149:39-50.
03. Baranowska B, Kochanowski J. Neuroendocrine aspects of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Neuroendocrinol Lett* 2018;39:172-8.
04. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccah D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PloS One* 2009;4:e7125.
05. Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol* 2007;595:489-503.
06. Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Dauge V, et al. Absence of the gut microbiota enhances

- anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2014;42:207-17
07. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444:1027-31
08. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;457: 480-4.
09. Aguirre M, Jonkers DM, Troost FJ, Roeselers G, Venema K. In vitro characterization of the impact of different substrates on metabolite production, energy extraction and composition of gut microbiota from lean and obese subjects. *PloS One* 2014;9:e113864.
10. de Groot PF, Frissen MN, de Clercq NC, Nieuwdorp M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: history, present and future. *Gut Microb* 2017;8:253-67.
11. Aroniadis OC, Drossman DA, Simren M. A perspective on brain-gut communication: the American gastroenterology association and American psychosomatic society joint symposium on brain-gut interactions and the intestinal microenvironment. *Psychosom Med* 2017;79:847-56.

12. Seitz J, Trinh S, Herpertz-Dahlmann B. The microbiome and eating disorders. *Psychiatr Clin* 2019;42:93-103.
13. Roubalova R, Prochazkova P, Papezova H, Smitka K, Bilej M, Tlaskalova-Hogenova H. Anorexia nervosa: gut microbiota-immune-brain interactions. *Clin Nutr* 2020;39:676-84.
14. Focker M, Timmesfeld N, Scherag S, Knoll N, Singmann P, Wang-Sattler R, et al. Comparison of metabolic profiles of acutely ill and short-term weight recovered patients with anorexia nervosa reveals alterations of 33 out of 163 metabolites. *J Psychiatr Res* 2012;46:1600-9.
15. Shih PB, Yang J, Morisseau C, German JB, Zeeland AA, Armando AM, et al. Dysregulation of soluble epoxide hydrolase and lipidomic profiles in anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 2016;21:537-46.
16. Kleiman, S.C.; Watson, H.J.; Bulik-Sullivan, E.C.; Huh, E.Y.; Tarantino, L.M.; Bulik, C.M.; Carroll, I.M. The intestinal microbiota in acute anorexia nervosa and during renourishment. *Psychosom. Med.* 2015, 77, 969–981.
17. Million, M.; Angelakis, E.; Maraninchi, M.; Henry, M.; Giorgi, R.; Valero, R.; Vialettes, B.; Raoult, D. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*,

- Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int. J. Obes.* 2013, 37, 1460–1466.
18. Mack, I.; Cuntz, U.; Grmer, C.; Niedermaier, S.; Pohl, C.; Schwiertz, A.; Zimmermann, K.; Zipfel, S.; Enck, P.; Penders, J. Weight gain in anorexia nervosa does not ameliorate the faecal microbiota, branched chain fatty acid profiles, and gastrointestinal complaints. *Sci. Rep.* 2016, 6, 26752.
 19. Borgo, F.; Riva, A.; Benetti, A.; Casiraghi, M.C.; Bertelli, S.; Garbossa, S.; Anselmetti, S.; Scarone, S.; Pontiroli, A.E.; Morace, G.; et al. Microbiota in anorexia nervosa: The triangle between bacterial species, metabolites and psychological tests. *PLoS ONE* 2017, 12, e0179739.
 20. Armougom, F.; Henry, M.; Vialettes, B.; Raccach, D.; Raoult, D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS ONE* 2009, 4, e7125.
 21. Morita, C.; Tsuji, H.; Hata, T.; Gondo, M.; Takakura, S.; Kawai, K.; Yoshihara, K.; Ogata, K.; Nomoto, K.; Miyazaki, K.; et al. Gut dysbiosis in patients with anorexia nervosa. *PLoS ONE* 2015, 10, e0145274.

22. Mörkl, S.; Lackner, S.; Müller, W.; Gorkiewicz, G.; Kashofer, K.; Oberascher, A.; Painold, A.; Holl, A.; Holzer, P.; Meinitzer, A.; et al. Gut microbiota and body composition in anorexia nervosa inpatients in comparison to athletes, overweight, obese, and normal weight controls. *Int. J. Eat. Disord.* 2017, 50, 1421–1431.
23. Mörkl, S.; Lackner, S.; Meinitzer, A.; Gorkiewicz, G.; Kashofer, K.; Painold, A.; Holl, A.; Holasek, S. Pilot study: Gut microbiome and intestinal barrier in anorexia nervosa. *Fortschr. Der Neurol. Psychiatr.* 2019, 87, 39–45.
24. Schulz, N.; Belheouane, M.; Dahmen, B.; Ruan, V.A.; Specht, H.E.; Dempfle, A.; Herpertz-Dahlmann, B.; Baines, J.F.; Seitz, J. Gut microbiota alteration in adolescent anorexia nervosa does not normalize with short-term weight restoration. *Int. J. Eat. Disord.* 2020, eat.23435
25. Prochazkova, P.; Roubalova, R.; Dvorak, J.; Tlaskalova-Hogenova, H.; Cermakova, M.; Tomasova, P.; Sediva, B.; Kuzma, M.; Bulant, J.; Bilej, M.; et al. Microbiota, microbial metabolites, and barrier function in a patient with anorexia nervosa after fecal microbiota transplantation. *Microorganisms* 2019, 7, 338.
26. De Clercq, N.C.; Frissen, M.N.; Davids, M.; Groen, A.K.; Nieuwdorp, M. Weight Gain after Fecal Microbiota

- Transplantation in a Patient with Recurrent Underweight following Clinical Recovery from Anorexia Nervosa. *Psychother. Psychosom.* 2019, 88, 52–54.
27. Bulant J, Hill M, Velíková M, Yamamotová A, Martásek P, Papežová H. Changes of BMI, steroid metabolome and psychopathology in patients with anorexia nervosa during hospitalization. *Steroids.* 2020;153:108523.
28. Burdo J, Booij L, Kahan E, Thaler L, Israël M, Agellon LB, Nitschmann E, Wykes L, Steiger H. Plasma levels of one-carbon metabolism nutrients in women with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord.* 2020 Sep;53(9):1534-1538.
29. Cifani C, Alboni S, Mucci A, Benatti C, Botticelli L, Brunello N, Micioni Di Bonaventura MV, Righi V. Serum metabolic signature of binge-like palatable food consumption in female rats by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *NMR Biomed.* 2021 Apr;34(4):e4469.
30. Leyrolle Q, Cserjesi R, Mulders MDGH, Zamariola G, Hiel S, Gianfrancesco MA, Rodriguez J, Porthault D, Amadiou C, Leclercq S, Bindels LB, Neyrinck AM, Cani PD, Karkkainen O, Hanhineva K, Lanthier N, Trefois P, Paquot N, Cnop M, Thissen JP, Klein O, Luminet O, Delzenne NM. Specific gut microbial,

biological, and psychiatric profiling related to binge eating disorders: A cross-sectional study in obese patients. *Clin Nutr.* 2021 Apr;40(4):2035-2044.

31. Salehi M A, Nilsson IA, Figueira J, Thornton LM, Abdulkarim I, Pålsson E, Bulik CM, Landén M. Serum profiling of anorexia nervosa: A ¹H NMR-based metabolomics study. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2021 Aug;49:1-10.
32. Miyata N, Hata T, Takakura S, Yoshihara K, Morita C, Mikami K, Nomoto K, Miyazaki K, Tsuji H, Sudo N. Metabolomics profile of Japanese female patients with restricting-type anorexia nervosa. *Physiol Behav.* 2021 Jan 1;228:113204.
33. Naisberg Y, Modai I, Weizman A. Metabolic bioenergy homeostatic disruption: a cause of anorexia nervosa. *Med Hypotheses.* 2001;56:454-61.
34. Lobera IJ, Bolaños Ríos P. Choice of diet in patients with anorexia nervosa. *Nutr Hosp.* 2009;24:682-7.
35. Schebendach JE, Mayer LE, Devlin MJ, Attia E, Contento IR, Wolf RL, Walsh BT. Food choice and diet variety in weight-restored patients with anorexia nervosa. *J Am Diet Assoc.* 2011 May;111(5):732-6.

36. Nguyen N, Dow M, Woodside B, German JB, Quehenberger O, Shih PB. Food-Intake Normalization of Dysregulated Fatty Acids in Women with Anorexia Nervosa. *Nutrients*. 2019 13;11:2208.
37. Tam FI, Gerl MJ, Klose C, Surma MA, King JA, Seidel M, Weidner K, Roessner V, Simons K, Ehrlich S. Adverse Effects of Refeeding on the Plasma Lipidome in Young Individuals With Anorexia Nervosa? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2021 Dec;60(12):1479-1490.
38. Föcker M, Cecil A, Prehn C, Adamski J, Albrecht M, Adams F, Hinney A, Libuda L, Bühlmeier J, Hebebrand J, Peters T, Antel J. Evaluation of Metabolic Profiles of Patients with Anorexia Nervosa at Inpatient Admission, Short- and Long-Term Weight Regain-Descriptive and Pattern Analysis. *Metabolites*. 2020;11:7.
39. Prochazkova P, Roubalova R, Dvorak J, Kreisinger J, Hill M, Tlaskalova-Hogenova H, Tomasova P, Pelantova H, Cermakova M, Kuzma M, Bulant J, Bilej M, Smitka K, Lambertova A, Holanova P, Papezova H. The intestinal microbiota and metabolites in patients with anorexia nervosa. *Gut Microbes*. 2021;13:1-25.
40. Tomášová P, Procházková P, Roubalová R, Dvořák J, Tlaskalová-Hogenová H, Čermáková M, Pelantová H, Šedivá B, Vecka M,

Papežová H, Kuzma M. NMR- and MS-Based Untargeted Metabolomic Study of Stool and Serum Samples from Patients with Anorexia Nervosa. *J Proteome Res.* 2022 Mar 4;21(3):778-787.

41. Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, et al. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry* 1998;59:22-33.
42. Fairburn CG, Cooper Z. The eating disorder examination. In: Fairburn CG, Wilson GT, editors. *Binge eating: nature, assessment, and treatment.* New York: Guilford Press; 1993. p. 317-60.
43. Calugi S, Ricca V, Castellini G, Lo Sauro C, Ruocco A, Chignola E, et al. The eating disorder examination: reliability and validity of the Italian version. *Eat Weight Disord* 2015;20:505-11.
44. De Leo D, Frisoni GB, Rozzini R, Trabucchi M. Italian community norms for the brief symptom inventory in the elderly. *Br J Clin Psychol* 1993;32: 209-13.

45. Derogatis LR, Spencer PM. The brief symptom inventory: Administration, scoring and procedures manual. Baltimore: Clinical Psychometric Research; 1982
46. Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome* 2014;2:6.
47. Albanese D, Fontana P, De Filippo C, Cavalieri D, Donati C. MICCA: a complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. *Sci Rep* 2015;5:9743.
48. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Env Microbiol* 2007;73:5261-7.
49. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Keller K, Brodie EL, Larsen N, Piceno YM, et al. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 2006;34:W394-9.
50. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Env Microbiol* 2006;72:5069-72.

51. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2e: approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS One* 2010;5:e9490.
52. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One* 2013;8: e61217.
53. Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'Hara B, Stevens MHH, Oksanen MJ, et al. The vegan package. *Community Ecol Package* 2007;10:631-7.
54. Westfall PH, Young SS. Resampling-based multiple testing: Examples and methods for p-value adjustment. New York: John Wiley & Sons; 1993.
55. Revelle WR. psych: Procedures for personality and psychological research. Software; 2017.
56. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011;12: R60.
57. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R foundation for statistical computing; 2008.

58. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 1995;57: 289-300.
59. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *PLS Methods*. 2001;58:109-30.
60. Mevik BH, Wehrens R. The pls package: principal component and partial least squares regression in R. *J Stat Softw*. 2007;1:1-23.
61. Kuhn M. Building predictive models in R using the caret package. *J Stat Softw*. 2008;1:1-26.
62. Szymańska E, Saccenti E, Smilde AK, Westerhuis JA. Doublecheck: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*. 2012;8:3-16.
63. Domingos P. MetaCost: a general method for making classifiers cost-sensitive. In: *Proceedings of the fifth ACM SIGKDD international conference on Knowledge Discovery and Data mining*. ACM Press: San Diego, CA, (1999).
64. Karnovsky A, Weymouth T, Hull T, Tarcea VG, Scardoni G, Laudanna C, et al. Metscape 2 bioinformatics tool for the analysis and visualization of metabolomics and gene expression data. *Bioinformatics*. 2012;28:373-80.

65. Nishida K, Ono K, Kanaya S, Takahashi K. KEGGscape: a Cytoscape app for pathway data integration. *F1000 Res.* 2014;3:144.
66. Guyon I, Weston J, Barnhill S, Vapnik V. Gene selection for cancer classification using support vector machines. *Mach Learn.* 2002;46:389–422.
67. Li T, Zhang C, Ogihara M. A comparative study of feature selection and multiclass classification methods for tissue classification based on gene expression. *Bioinformatics.* 2004;20:2429–37.
68. Wang L, Chu F, Xie W. Accurate cancer classification using expressions of very few genes. *ACM Tran Comput Biol Bioinforma.* 2007;4:40–53.
69. Li MX, Yeung JM, Cherny SS, Sham PC. Evaluating the effective numbers of independent tests and significant p-value thresholds in commercial genotyping arrays and public imputation reference datasets. *Hum Genet.* 2012;131:747–56.
70. Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for singlenucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet.* 2004;74:765–9.

71. Mitchell M. An introduction to genetic algorithms. MIT press: Cambridge, MA; 1998.
72. Revelle WR. psych: Procedures for personality and psychological research. Software; 2017.
73. Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *Int J Obes* 2013;37:216-23.
74. Troisi J, Landolfi A, Sarno L, Richards S, Symes S, Adair D, et al. A metabolomics-based approach for non-invasive screening of fetal central nervous system anomalies. *Metabolomics*. 2018;14:77.
75. Herpertz-Dahlmann B, Seitz J, Baines J. Food matters: how the microbiome and gut-brain interaction might impact the development and course of anorexia nervosa. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2017;26:1031-41.
76. Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ Microbiol*. 2010;12:304-14.

77. Schroeder FA, Lin CL, Crusio WE, Akbarian S. Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol Psychiatry*. 2007;62:55-64.
78. Davis M, Ressler K, Rothbaum BO. Effects of d-cycloserine on extinction: translation from preclinical to clinical work. *Biol Psychiatry*. 2006;60:369-75.
79. Siegmund A, Golfels F, Finck C. D-Cycloserine does not improve but might slightly speed up the outcome of in-vivo exposure therapy in patients with severe agoraphobia and panic disorder in a randomized double blind clinical trial. *J Psychiatr Res*. 2011;45:1042-7.
80. Levinson CA, Rodebaugh TL, Fewell L, Kass AE, Riley EN, Stark L, et al. D-Cycloserine facilitation of exposure therapy improves weight regain in patients with anorexia nervosa: a pilot randomized controlled trial. *J Clin Psychiatry*. 2015;76:787-93.
81. Allen KL, Mori TA, Beilin L, Byrne SM, Hickling S, et al. Dietary intake in population-based adolescents: support for a relationship between eating disorder symptoms, low fatty acid intake and depressive symptoms. *J Hum Nutr Diet*. 2013;26:459-69.

82. Satogami K, Tseng PT, Su KP, Takahashi S, Ukai S, Li DJ, et al. Relationship between polyunsaturated fatty acid and eating disorders: systematic review and meta-analysis. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2019;142:11-19.
83. Shih PB, Morisseau C, Le T, Woodside B, German JB. Personalized polyunsaturated fatty acids as a potential adjunctive treatment for anorexia nervosa. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2017;133:11-19.4.
84. Nakai Y, Noma S, Fukusima M, Taniguchi A, Teramukai S. Serum lipid levels in patients with eating disorders. *Intern Med*. 2016;55:1853-7

7. TABELLE E FIGURE

Tabella 1. Principali studi che hanno esaminato il microbioma fecale nell'Anoressia Nervosa

Autore	Anno	Principali risultati
Kleiman	2015	Diminuzione della diversità alfa al ricovero e alla dimissione dalla struttura di trattamento, differenza significativa in beta diversità
Mack	2016	Aumento delle specie di Clostridium, diminuzione delle specie di Roseburia, nessun cambiamento nella diversità alfa
Borgo	2017	Aumento delle specie di Enterobacteriaceae e M. smithii, ridott e specie di Roseburia, Clostridium e Ruminococcus, nessun cambiamento nella diversità alfa.
Mörkl	2017	Diminuzione della diversità alfa
Mörkl	2019	Diminuzione della diversità alfa, nessun cambiamento nella permeabilità intestinale (nessuna variazione della zonulina plasmatica).
Schluz	2020	Aumento della diversità alfa
Prochazkova	2019	Miglioramento della funzione della barriera intestinale e della diversità alfa, aumento degli SCFA e della serotonina.
De Clercq	2019	Aumento dell'adiposità senza variazione dell'apporto calorico.

Tabella 2. Sintesi dei principali studi con approccio metabolomico nell'Anoressia Nervosa

Autore	Anno	Metodologia	Analisi	Campione	Pazienti	Principali risultati
Föcker	2021	Targeted	FIA-MS/MS	Siero	35 AN in fase acuta 26 recupero a breve termine 22 recupero a lungo termine 25 controlli sani	- Lieve iperamminoacidemia in AN - Aumento delle concentrazioni di glutammina, glicina, istidina, leucina, metionina, ornitina, fenilalanina, serina, triptofano in AN; - Aumento di acilcarnitine, fosfatidilcoline e sfingomieline in pazienti ai diversi tempi - Somma inferiore degli esosi nei pazienti rispetto ai controlli
Föcker	2012	Targeted	FIA-MS/MS	Siero	29 AN in fase acuta 19 recupero a breve termine 16 controlli sani	- Lieve iperamminoacidemia nei pazienti - Aumento delle acilcarnitine, delle fosfatidilcoline e delle sfingomieline in AN; - Aumento degli esosi nei pazienti
Burdo	2020	Targeted	LC-MS/MS	Plasma	30 AN-R 23 AN-BP 9 AN-R in remissione 31 AN-BP in remissione 36 controlli sani	- Aumento di B12 e betaina nell'AN attiva - Nessuna differenza in colina e mettionina
Bulant	2020	Targeted	GC-MS	Siero	33 AN	- Aumento della leptina - Aumento del 20 α -diidro-pregnenolone solfato e del pregnenolone solfato dopo il trattamento - Diminuzione di 5-androstene-3 β ,7 β ,17 β -triolo, 7 β -OH-DHEA, epietiocholanolone ed epipregnanolone dopo il trattamento
Miyata	2021	Targeted Untargeted	UPLC-MS CE-MS LC-MS/MS	Siero	10 AN-R 10 controlli sani	- più bassi livelli di alanina, asparagina, betaina, istidina, allo-isoleucina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, taurina, tirosina in AN rispetto ai controlli; - Livelli più bassi di cis-aconitato, betaina, colina, metil-2-ossovalerato e oxovalerato in AN; - Tossine uremiche aumentate in AN: p-cresil solfato, ippurato, indoxyl solfato, indolo-3-acetato, fenilacetato e fenil solfato, acido guanidinosuccinico, N2-fenilacetilglutammina
Prochazkova	2021	Targeted Untargeted	H NMR MS (SIM)	Feci	59 AN-R 67 controlli sani	- Diminuzione dell'acetato sia prima che dopo il trattamento; - Diminuzione della dopamina e GABA e butirrato nell'AN acuta; - Aumenta la serotonina, propionato e butirrato dopo il trattamento.
Salehi	2021	Untargeted	H NMR	Siero	65 AN 65 AN in remissione 65 controlli sani	- Glutammina più alta nell'AN acuta rispetto ai controlli e ai pazienti guariti - Aumento del Thr nell'AN recuperato rispetto all'AN acuta

Nguyen	2019	Untargeted	GC-MS	Plasma	30 AN in fase acuta 20 AN in remissione 47 controlli sani	- Più bassi livelli di metanolo, glucosio, glicoproteine a univariato in AN acuta, solo metanolo ad analisi multivariata in AN acuta e recuperata; - Aumento dell'ALA in entrambi i tempi in AN rispetto ai controlli - Aumento dell'acido laurico saturo, dell'acido alfa-linoleico polinsaturo n-3, dell'acido eicosapentaenoico, dell'acido docosapentaenoico a digiuno in AN rispetto ai controlli; - Aumento dell'acido alfa-linoleico polinsaturo n-3 al tempo post-prandiale in AN rispetto ai controlli.
Cifani	2020	Untargeted	H NMR	Siero	32 ratti femmine dividi in 4 gruppi: 1. no-restrizione/no-stress, 2. no-restrizione/stress, 3. restrizione/non-stress, 4. restrizione/stress	glicoproteine, thr, gly, gln, ac e lac sono emersi come possibili biomarcatori per il comportamento binge-eating
Tam	2021	Targeted	CG-MS	Plasma	39 AN in fase acuta 37 controlli sani	- Aumento del colesterolo e di altri metaboliti della lecitina-colesterolo aciltransferasi, esteri del colesterolo, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilinositolo e sfingomielina nell'AN acuta rispetto ai controlli; - Aumento di ceramides colesterolo, esteri di colesterolo, fosfatidilcoline, etere-fosfatidiletanolamine, fosfatidilinositolo e sfingomielina dopo recupero ponderale
Tomasova, P.	2021	Untargeted	NMR MS	Feci Siero	49/57 AN in fase acuta analizzati con MS/NMR 40/52 AN dopo ospedalizzazione analizzati con MS/NMR 62/60 controlli sani analizzati con MS/NMR	- Aumento dei livelli di IL-17 sia nell'AN acuta che dopo il ricovero in ospedale; aumento dei livelli di piruvato e lattato; - Diminuzione dei livelli di tiroxina libera e livelli di ormone stimolante la tiroide, glucosio, vitamine, corpi chetonici
Leyrolle, Q.	2021	Untargeted	CG-MS	Plasma	39 pazienti obesi, 15 con BED e 24 no BED	- Aumento dei livelli di BADGE,2H(2)O e isovalerilcarnitina in pazienti obesi con BED

Tabella 3. Caratteristiche cliniche dei soggetti arruolati. Dati espressi come media e DS

	AN-T0 (n = 24)	AN-T1 (n = 16)	Controlli (n = 20)	<i>F</i> _{2,57}	<i>P</i>
Età, anni	21.6 ± 4.2	21.8 ± 4.4	23.0 ± 3.2	1.72	0.30
BMI, kg/m ²	14.9 ± 1.7	20.6 ± 0.7	20.3 ± 1.4	99.84	<0.00001
EDE restraint	4.4 ± 0.9	1.1 ± 1.2	0.2 ± 0.6	123.67	<0.00001
EDE-eating concern	3.7 ± 1.1	1.4 ± 0.8	0.4 ± 0.3	94.69	<0.00001
EDE weight concern	4.0 ± 1.3	2.0 ± 1.3	0.3 ± 0.6	56.70	<0.00001
EDE shape concern	4.7 ± 1.2	3.1 ± 1.1	0.5 ± 1.0	69.20	<0.00001
BSI somatization	1.9 ± 0.9	0.7 ± 0.8	0.1 ± 0.2	31.26	<0.00001
BSI obsessive- compulsive	2.3 ± 0.9	1.4 ± 0.9	0.3 ± 0.4	31.97	<0.00001
BSI interpersonal sensitivity	2.8 ± 0.7	1.8 ± 1.1	0.1 ± 0.2	62.87	<0.00001
BSI depression	2.8 ± 0.6	1.8 ± 0.9	0.2 ± 0.2	86.67	<0.00001
BSI anxiety	2.7 ± 0.7	1.5 ± 0.9	0.4 ± 0.2	56.82	<0.00001
BSI hostility	1.7 ± 1.0	0.9 ± 0.9	0.2 ± 0.3	19.54	<0.00001
BSI phobic anxiety	1.5 ± 0.9	1.1 ± 0.9	0.08 ± 0.1	19.77	<0.00001
BSI paranoid ideation	1.9 ± 0.8	1.3 ± 0.8	0.1 ± 0.3	31.75	<0.00001
BSI psychoticism	2.2 ± 0.7	1.3 ± 0.8	0.1 ± 0.2	49.03	<0.00001

Tabella 4. Cambiamenti del metabolita fecale rispetto ai controlli sani nelle donne con anoressia nervosa (AN) al T1 e al T2.

Metabolite	AN-T0 (n = 24)	AN-T1 (n = 16)	Metabolite selection criteria
Valeric acid	↑	↑	Volcano
Propionic acid	↑	→	VIP-score Volcano
3-methyl,2- ketobutyric acid	↑	↑	VIP-score Volcano
Stearic acid	↑	→	VIP-score Volcano GA
Linolenic acid	↑	→	Volcano
Methyl-galactoside	↑	→	Volcano GA
Coprosterol	↑	→	VIP-score Volcano GA
Cycloserine	↑	→	VIP-score Volcano
Lauric acid	↑	→	Volcano
Hydroxystearic acid	→	↑	Volcano
Piperine	→	↓	Volcano
Phenylalanine	→	↓	Volcano GA
Xylose	↓	→	VIP-score Volcano GA
Fucose	↓	→	VIP-score Volcano GA
Rhamnose	↓	→	VIP-score Volcano GA
Butyric acid	→	↓	Volcano
Meso-erythritol-1	→	↓	Volcano

↑ = increased; ↓ = decreased; → = unchanged

GA genetic algorithm

Figura 2. Cladogrammi generati da LefSe che indicano differenze nei taxa batterici tra pazienti con anoressia nervosa in fase acuta (AN-T0) e controlli sani (A), e tra pazienti con ripristino del peso (AN-T1) e controlli sani (B). I nodi in rosso indicano i taxa che sono stati arricchiti in AN rispetto ai controlli, mentre i nodi in verde indicano la tendenza opposta. Sotto ciascun pannello sono stati riportati i punteggi LDA per i taxa batterici abbondanti in maniera differenziale tra i due gruppi. Vengono riportati solo i taxa con $p < 0,01$ (test della somma dei ranghi di Wilcoxon) e $LDA > 2,0$.

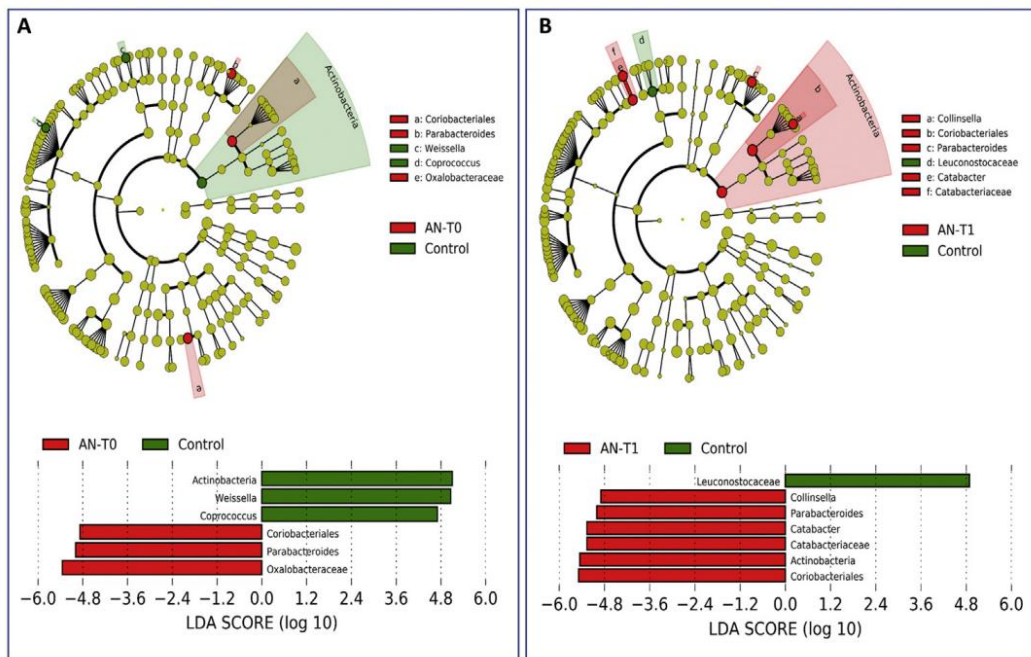


Figura 3. (A) Modelli di analisi discriminante dei minimi quadrati parziali (PLS2-DA) per discriminare i controlli sani (CTRL), i pazienti AN in fase acuta (AN-T0) e i pazienti AN dopo il ripristino del peso a breve termine (AN-T1). La varianza di ciascun componente è mostrata tra parentesi sull'asse corrispondente. (B) Rappresentazione 3-D del modello PLS2-DA. Si osserva una chiara separazione tra le classi studiate. (C) Accuratezza, stima dei risultati R2 e Q2 tramite convalida incrociata. Q2 è una valutazione della capacità di predittività del modello. In ogni convalida incrociata, i dati previsti vengono confrontati con i dati originali e viene calcolata la somma dell'errore al quadrato. Le migliori prestazioni di previsione sono fornite dal modello con un numero di componenti che forniscono il Q2 più alto. Questa condizione è evidenziata in figura con un riquadro e corrisponde al modello a sei componenti. (D) Risultati del test di permutazione basati su 2000 iterazioni. (E) Importanza variabile nella proiezione (VIP) dei 14 metaboliti. Come valore di cutoff è stato considerato un VIP score $\geq 1,5$. Le caselle colorate a destra indicano la quantità relativa del corrispondente metabolita in ciascun gruppo in studio. (F) Rappresentazione 3D del modello PCA che mostra una netta separazione tra le classi studiate coerentemente con il modello PLS2-DA

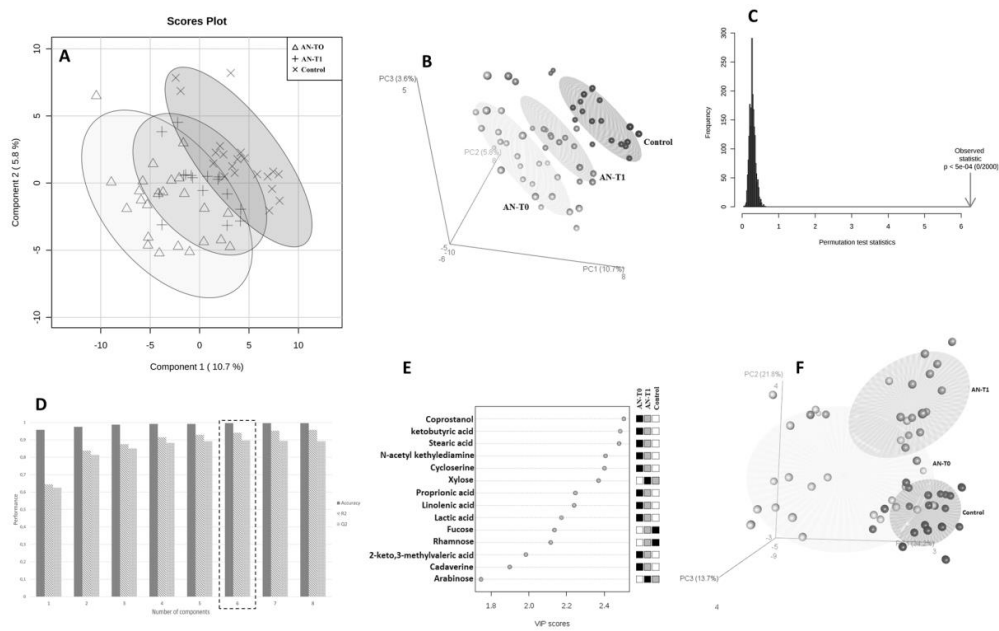


Figura 4. Volcano plot dei metabolite esaminati. **(A)** Fold change e p-value delle concentrazioni dei metaboliti tra controlli sani e pazienti AN al T0: 1 = coprosterolo, 2 = cicloserina, 3 = acido valerico, 4 = acido stearico, 5 = metil-galattoside, 6 = xilosio, 7 = 3-metil,2 -acido chetobutirrico, 8 = acido propionico, 9 = fucosio, 10 = acido linolenico, 11 = acido laurico, 12 = ramnosio, **(B)** Fold change e p-value delle concentrazioni dei metaboliti tra controlli sani e soggetti AN al T1: 1 = acido butirrico, 2 = piperina, 3 = meso eritritolo, 4 = fenilalanina, 5 = acido valerico, 6 = acido idrossistearico, 7 = acido 3-metil,2-chetobutirrico

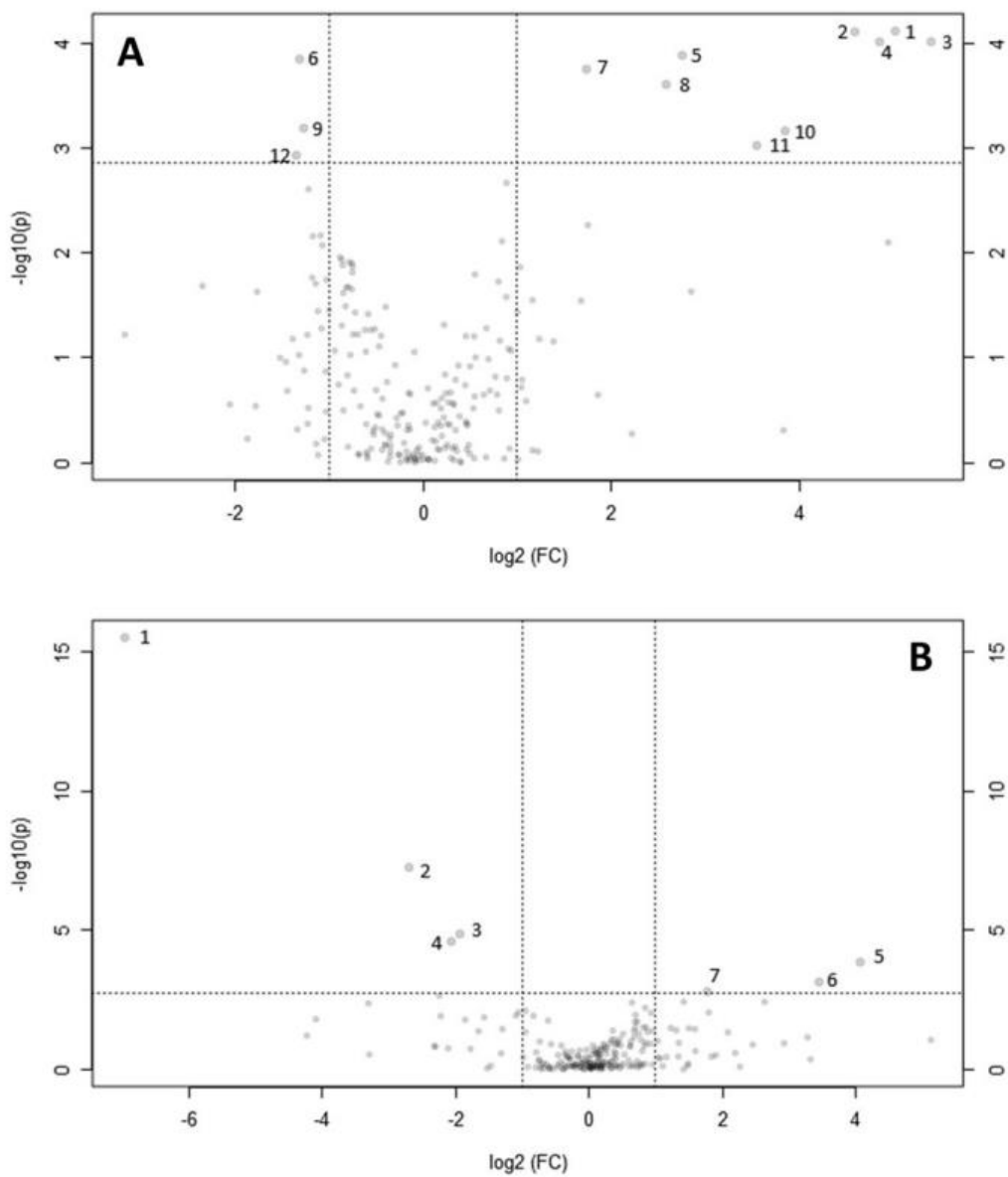


Figura 7. *Heatmap* che riporta la concentrazione dei metaboliti selezionati secondo l'algoritmo genetico nei soggetti sani (CTRL), nei pazienti con anoressia nervosa al T0 e nei pazienti al T1. Le distanze dei metaboliti sono state valutate in base alla distanza di Minkowski, mentre il clustering secondo l'algoritmo di Wald. Segnali multipli dovuti alla derivatizzazione dei metaboliti sono stati indicati con numero crescente (es. Arabinosio, Arabinosio 2, Arabinosio 3). 2-KMVA $\frac{1}{4}$ acido 2-cheto-3-metilvalerico, 2-HCCA $\frac{1}{4}$ acido 2-idrossicicloesano-1-carbossilico, 3-MKBA $\frac{1}{4}$ acido 3-metil-2-chetobutirrico, 4-HBA $\frac{1}{4}$ acido 4-idrossibutirrico, 2-HBA $\frac{1}{4}$ acido 2-idrossibutirrico, 4-HBenzAA $\frac{1}{4}$ acido 4-idrossibenzeneacetico, 2-HICA $\frac{1}{4}$ acido 2-isocaprico, 3-HPPA $\frac{1}{4}$ acido 3-(3-idrossifenil)propanoico

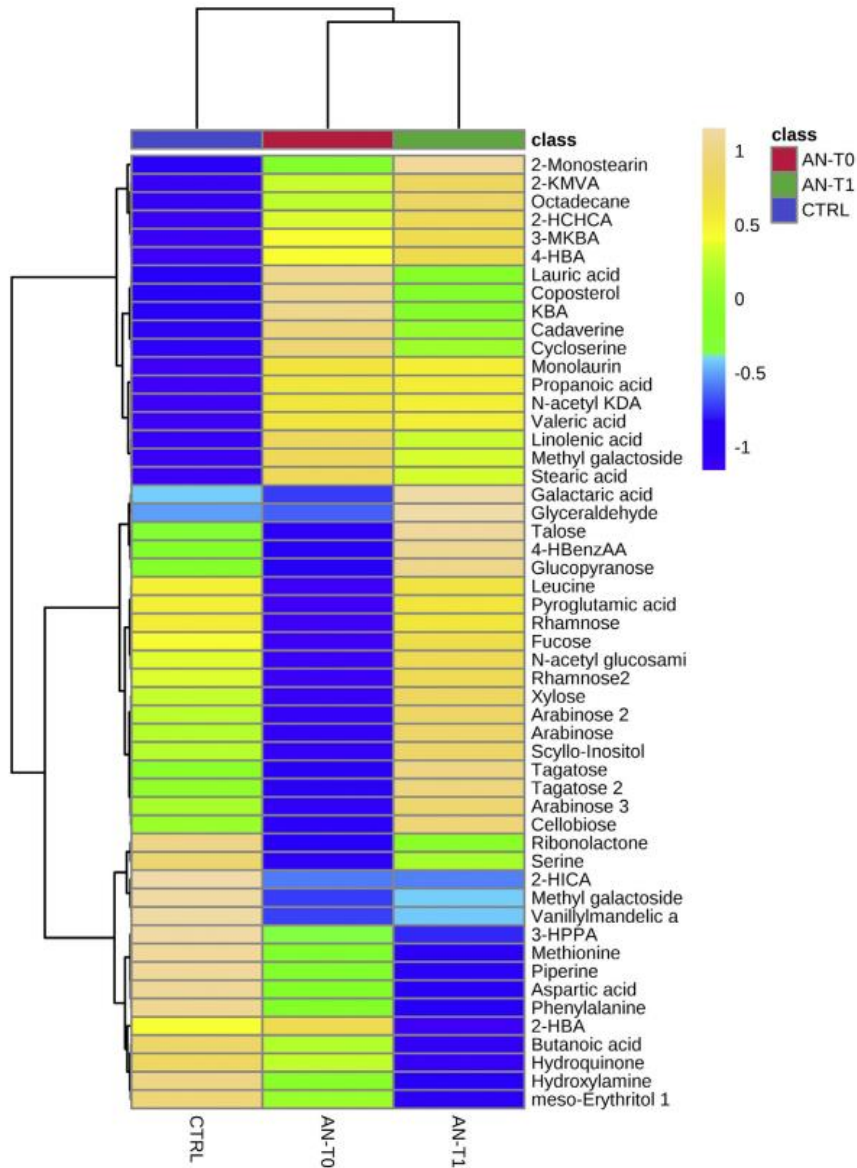


Tabella 8. *Heatmap* dei coefficienti di correlazione di Spearman (r) per ogni coppia di combinazioni tra abbondanze di genere microbico e intensità dei metaboliti, valutati nei soggetti con Anoressia Nervosa al baseline (AN-T0) **(A)** e nei soggetti con Anoressia Nervosa dopo recupero di peso a breve termine (AN-T1) **(B)** e nei soggetti sani [CTRL] **(C)**.

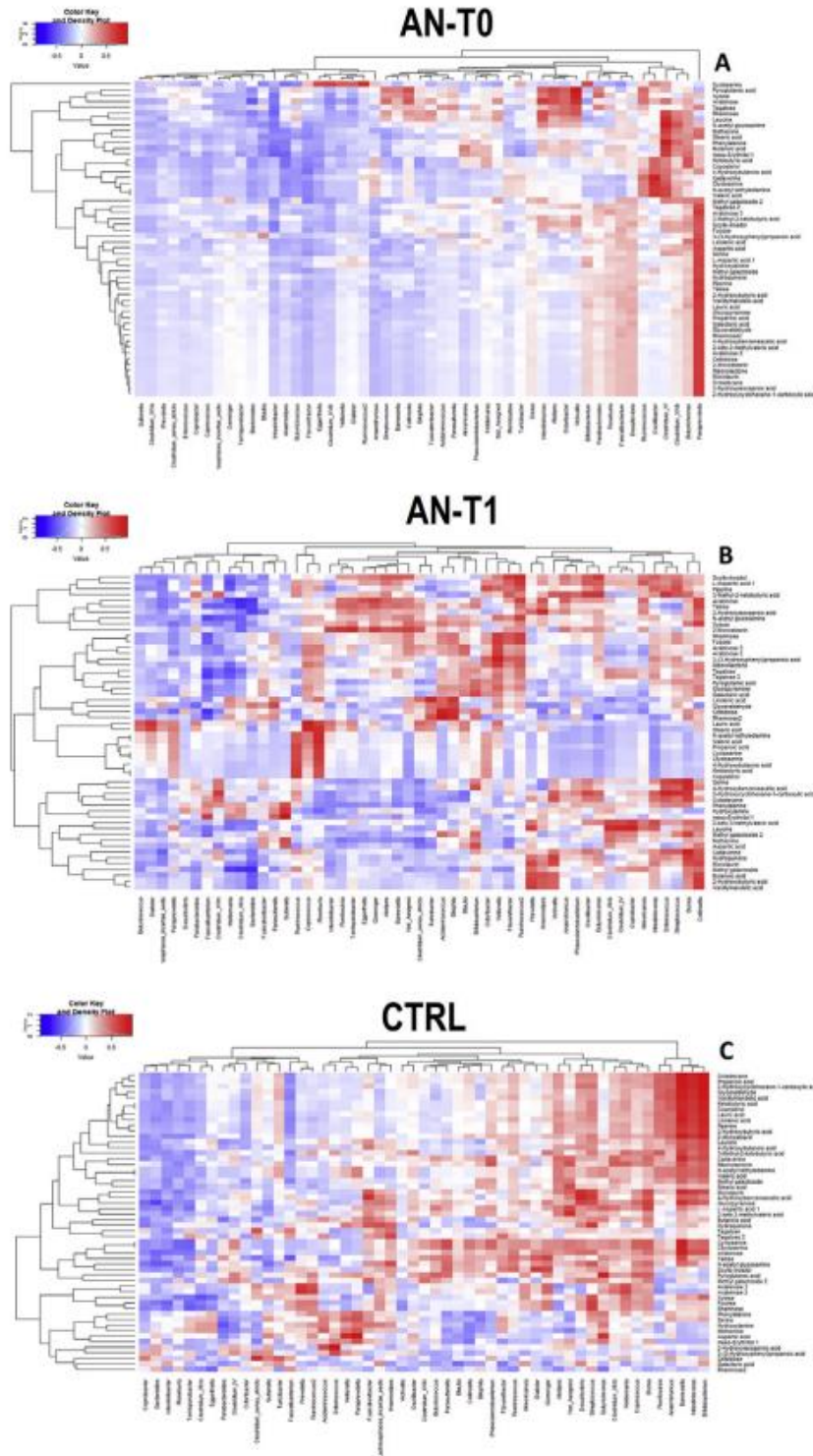


Tabella 9. *Heatmap* de i coefficienti di correlazione di Spearman (r) per ciascuna coppia di combinazioni tra abbondanze di genere microbico e punteggi del Brief Symptom Inventory (BSI) in pazienti con anoressia nervosa nella fase acuta (AN-T0) (A) e dopo il ripristino del peso (AN-T1) (B) e nei soggetti sani (CTRL) (C). I pannelli DeF riportano i coefficienti di correlazione di Spearman tra i punteggi dell'abbondanza di genere e dell'esame dei disturbi alimentari (EDE) e i valori dell'indice di massa corporea (IMC)

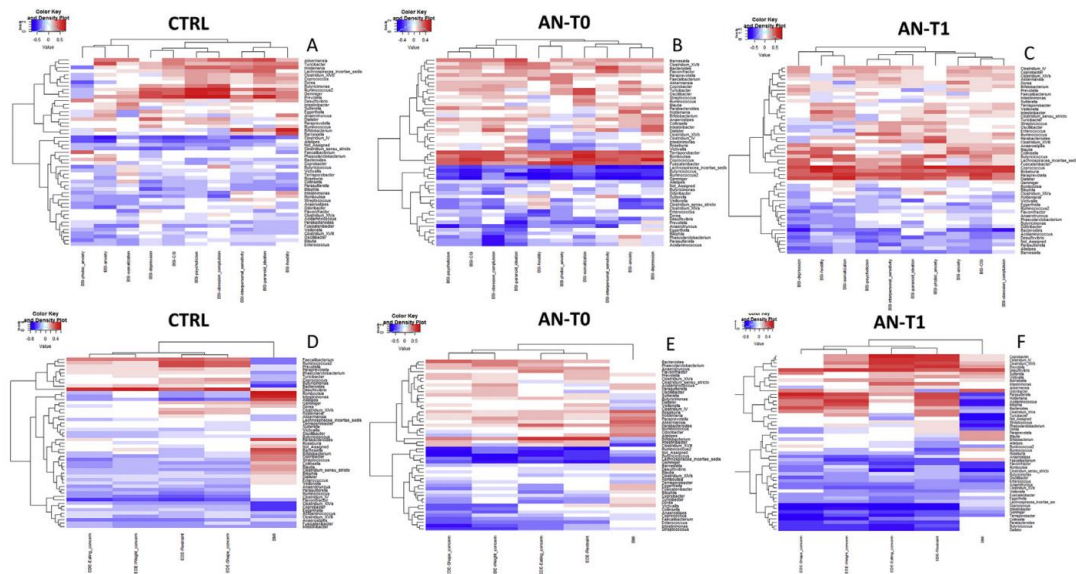


Figura S2. Mappe del sistema metabolico che sintetizzano la via più breve che può spiegare le interazioni tra i 14 metaboliti selezionati dal modello AN-T0/An-T1/CTRL. C'è una chiara interazione di diversi percorsi che coinvolgono la degradazione di valina, leucina e isoleucina; glicolisi e gluconeogenesi; metabolismo della metionina e della cisteina; metabolismo di glicina, serina alanina e treonina; metabolismo del linoleato

