

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE,  
RIABILITAZIONE, OFTALMOLOGIA, GENETICA E  
SCIENZE MATERNO-INFANTILI – DINO GMI

## Scuola di Specializzazione in Pediatria



### TESI DI SPECIALIZZAZIONE

Caratterizzazione del profilo cognitivo e metagenomico nella  
Distrofia Muscolare di Duchenne

**Relatore:**

Prof. Mohamad Maghnie

**Candidata:**

Dott.ssa Sara Casalini

**Correlatore:**

Prof. Claudio Bruno

## Indice

1	Razionale dello studio .....	3
2	La distrofia muscolare di Duchenne.....	4
2.1	Epidemiologia.....	4
2.2	Eziopatogenesi.....	4
2.3	Clinica.....	5
2.4	Diagnosi.....	6
2.5	Follow-up clinico- strumentale.....	8
2.6	Terapia .....	9
2.6.1	Terapie disponibili.....	9
2.6.2	Le terapie in corso di sperimentazione.....	11
2.6.3	Farmaci che agiscono sui difetti secondari al deficit della distrofina .....	14
2.6.4	Altre terapie.....	15
3	Coinvolgimento del Sistema Nervoso Centrale nella DMD .....	15
3.1	I disturbi cognitivo-comportamentali .....	15
3.2	Correlazioni genotipo-fenotipo.....	16
3.2.1	Relazione tra isoforme della distrofina e coinvolgimento del sistema nervoso centrale	16
3.2.2	Relazione tra aspetto neuropatologico e fenotipo cognitivo .....	18
3.2.3	Relazione tra genotipo e fenotipo neuroradiologico .....	18
4	Il microbiota intestinale.....	19
4.1	L'asse microbiota-intestino-cervello .....	20
4.2	Il ruolo del microbiota nelle patologie neuropsichiatriche.....	21
4.3	La metagenomica.....	22
4.4	Bristol Stool Scale .....	23
5	Materiali e metodi .....	24
6	Risultati .....	26
7	Discussione.....	44
8	Bibliografia.....	49

## **1 Razionale dello studio**

La Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) è la più frequente e grave distrofia muscolare dell'età pediatrica e si caratterizza per la degenerazione progressiva dei muscoli scheletrici (1). E' una patologia a trasmissione X-linked recessiva causata dall'assenza della proteina distrofina. Circa un terzo dei pazienti con DMD presenta anche una disabilità cognitivo-comportamentale caratterizzata da difficoltà di apprendimento, problemi comportamentali, disabilità intellettiva.

Negli ultimi anni è stato dimostrato che il microbiota intestinale, l'insieme dei microorganismi che risiede nell'intestino umano, è in grado di influenzare le funzioni fisiologiche, cognitive e comportamentali a livello cerebrale. Numerose malattie che coinvolgono il sistema nervoso centrale sono state studiate in relazione alla composizione del microbiota intestinale e al ruolo che si ipotizza esso possa svolgere nella patogenesi o nella modulazione della gravità delle patologie stesse.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di studiare la composizione del microbiota intestinale in pazienti affetti da DMD con o senza disabilità cognitivo-comportamentale, per comprendere quali siano i fattori che caratterizzano il profilo cognitivo di questi pazienti per poterne migliorare la presa in carico e sviluppare interventi terapeutici efficaci.

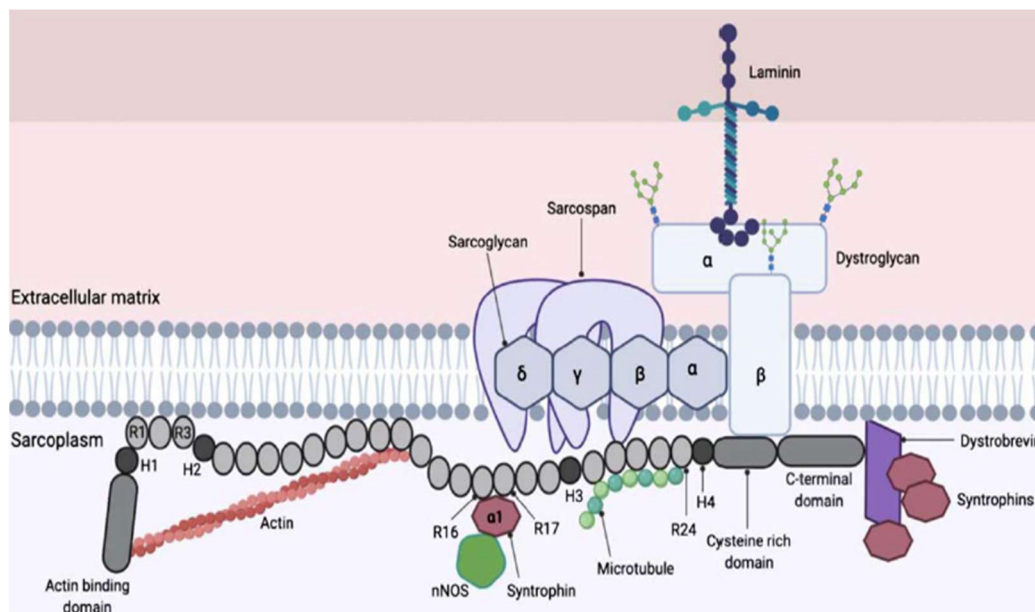
## 2 La distrofia muscolare di Duchenne

### 2.1 Epidemiologia

In Italia la DMD ha un'incidenza di circa 1 su 3.500 nati maschi (2). A livello globale la prevalenza è di 7.1 casi per 100 000 maschi e di 2,8 casi per 100 000 nella popolazione generale (3).

### 2.2 Eziopatogenesi

La distrofia muscolare di Duchenne è causata da mutazioni del gene DMD che codifica per la proteina distrofina. Nel muscolo quest'ultima lega l'F-actina del citoscheletro con la matrice extracellulare tramite i domini N-terminale e C-terminale. La distrofina interagisce con il sarcolemma, il citoscheletro e le proteine canale, questo nell'insieme viene chiamato DAPC (dystrophin associated protein complex). Il deficit di distrofina determina il disassemblaggio del DAPC e la perdita dell'interazione tra l'F-actina e la matrice extracellulare che contribuisce al danno muscolare. Le cellule muscolari danneggiate sono infiltrate da cellule infiammatorie e nelle fasi avanzate di malattia sostituite da tessuto fibrotico e adiposo.



**Figura 1.** Rappresentazione schematica della distrofina e del DAPC (dystrophin associated protein complex) (Elangkovan N. et al, 2021).

Dal punto di vista genetico circa il 60-70% delle mutazioni del gene DMD sono delezioni, 5-15% sono duplicazioni e il 20% sono mutazioni puntiformi, piccole delezioni o inserzioni (1).

### **2.3 Clinica**

La distrofia muscolare di Duchenne è caratterizzata da debolezza muscolare che coinvolge inizialmente la muscolatura del cingolo pelvico. I primi sintomi si manifestano già nella prima infanzia, intorno ai 2-3 anni di vita, con ritardo nell'acquisizione della deambulazione autonoma, difficoltà nella corsa o nel salire le scale, frequenti cadute, andatura anserina e difficoltà nel rialzarsi da terra (segno di Gowers positivo) (4). I bambini affetti da DMD in un 50% dei casi possono presentare anche un ritardo nell'acquisizione del linguaggio e nel 30% dei casi manifestano disabilità cognitivo-comportamentali (5).

Con il progredire della patologia, la deambulazione diventa progressivamente digitigrada, come conseguenza delle retrazioni a carico dei tendini di Achille, che impediscono di appoggiare la pianta del piede a terra, e si rende evidente l'iperlordosi lombare. La progressione della patologia determina la perdita della deambulazione autonoma in media intorno a 12 anni di età, seguita da complicanze quali scoliosi, perdita della funzionalità del cingolo scapolare, insufficienza respiratoria su base restrittiva e cardiomiopatia. Attualmente, grazie al miglioramento della gestione delle complicanze cardiache e respiratorie e all'utilizzo della terapia corticosteroidica, la perdita della deambulazione si verifica intorno ai 13-14 anni di età (6), inoltre l'aspettativa di vita alla nascita ha raggiunto i 30-40 anni e il decesso avviene solitamente per complicanze respiratorie o cardiache (7).

Un tempo, era l'insufficienza respiratoria la prima causa di morte per questi pazienti (8). Ad oggi il monitoraggio attento della funzione polmonare unitamente al trattamento tempestivo dell'insufficienza respiratoria con ventilazione meccanica fanno sì che la funzionalità cardiaca sia il principale determinante della sopravvivenza (9).

A partire dai 10-12 anni di età inizia ad essere coinvolto anche il muscolo cardiaco in forma di cardiopatia ipertrofico-dilatativa a carico delle camere cardiache sinistre, tanto che intorno ai 18 anni, l'80% dei pazienti manifesta cardiopatia (10–12). È pertanto indicato, a scopo preventivo, l'avvio di terapia con inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE-inibitori) o farmaci antagonisti del recettore per l'angiotensina II a partire dai 10 anni di età nei pazienti affetti da DMD con una funzione cardiaca normale (13).

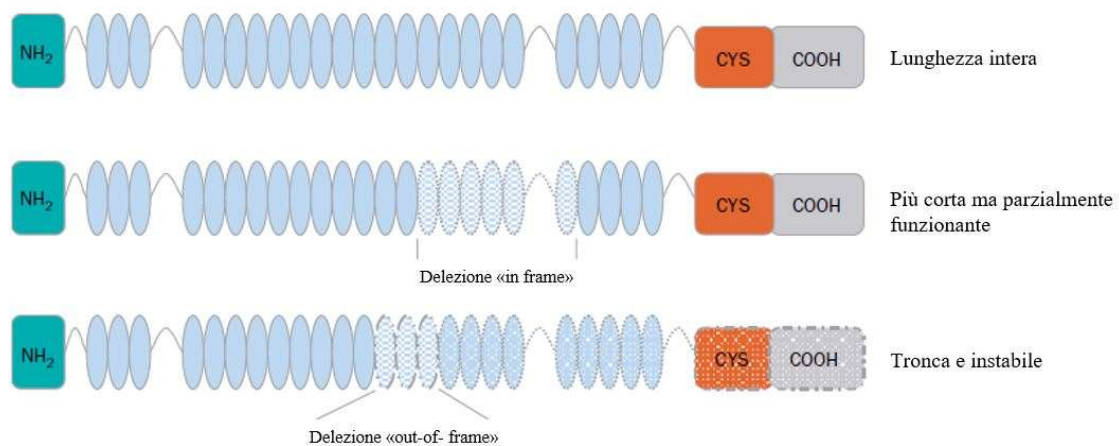
In ultimo, i soggetti affetti da DMD presentano spesso complicazioni gastrointestinali o nutrizionali, tra cui aumento o perdita di peso, squilibri nutrizionali o idroelettrolitici, bassa densità minerale ossea o disturbi della deglutizione (14).

#### **2.4 Diagnosi**

Quando viene posto il sospetto clinico di DMD, è fondamentale eseguire il dosaggio della creatinfosfochinasi plasmatica (CK), che raggiunge valori superiori alle 10-20 volte il range di normalità intorno ai 2 anni di vita per poi decrescere lentamente in relazione alla progressiva degenerazione muscolare (15). Tuttavia, il CK elevato è un marcatore aspecifico di danno muscolare e quindi non sufficiente per porre diagnosi di DMD. Si rende pertanto necessario proseguire l'iter diagnostico con indagini genetico-molecolari, ricercando mutazioni sul gene della distrofina. L'identificazione della mutazione causativa è anche indispensabile per la ricerca dello stato di portatrice nella madre e per proseguire nel counselling genetico familiare, oltre che per determinare se il paziente possa essere candidato a terapie mutazione-specifiche (1). L'indagine genetico-molecolare di primo livello è quella condotta con metodica MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), in grado di evidenziare la presenza di delezioni e duplicazioni, che rappresentano circa il 60-70% delle mutazioni associate a distrofinopatia. In caso di negatività dell'MLPA, in presenza di un elevato sospetto clinico di distrofinopatia, è raccomandato eseguire il sequenziamento diretto del gene per ricercare

mutazioni puntiformi e piccole delezioni che nel complesso costituiscono circa il 25 % delle mutazioni associate a distrofinopatia. L'ultimo 5% delle mutazioni è costituito da riarrangiamenti complessi o alterazioni introniche che possono essere ricercate con lo studio dell'RNA estratto da muscolo tramite RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) (16).

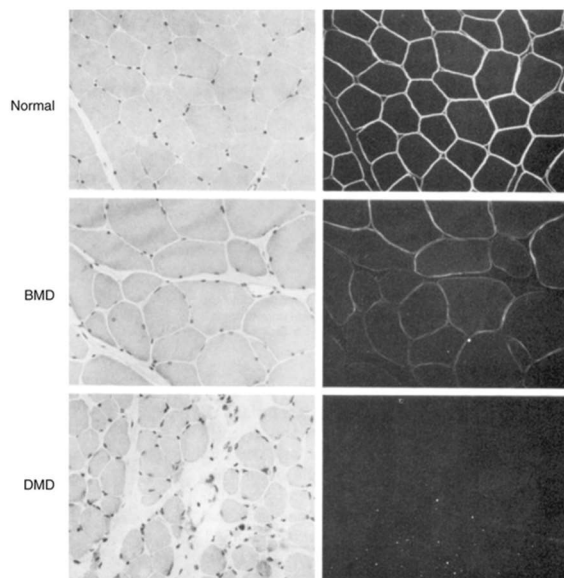
Non tutte le mutazioni sul gene della distrofina determinano un fenotipo DMD, essendo alcune associate al fenotipo lieve/moderato della Distrofia Muscolare di Becker (DMB). Nel caso di delezioni e duplicazioni, la severità del fenotipo non dipende dall'estensione della delezione/duplicazione, quanto, piuttosto, dal mantenimento della cornice di lettura o meno. Infatti, le mutazioni che mantengono la cornice di lettura (dette mutazioni in-frame) generano di solito una proteina tronca ma parzialmente funzionale e si associano pertanto al fenotipo DMB. Nei pazienti che presentano un fenotipo severo, DMD, le mutazioni determinano la perdita della cornice di lettura (dette mutazioni out-of-frame), esitando nella completa assenza della proteina sulla membrana plasmatica (17).



**Figura 2.** Effetti delle diverse mutazioni sulla proteina distrofina (Muntoni et al, 2006)

La biopsia muscolare ha ancora un ruolo nella diagnosi delle distrofinopatie. È importante notare che fino al 7% dei pazienti affetti da distrofinopatie può presentare mutazioni non rilevabili dall'analisi del DNA genomico e che molti presentano mutazioni introniche profonde

che richiedono l'analisi dell'mRNA derivato dal muscolo per essere identificate. La biopsia muscolare rimane utile anche per valutare l'espressione della proteina distrofina nel caso di discordanza tra fenotipo e genotipo (18,19). Se la distrofina è completamente assente all'immunofluorescenza o al Western blot, si può porre diagnosi di DMD. Quando invece si riscontra una distrofina parzialmente espressa in immunofluorescenza o di dimensioni ridotte al Western blot si pone diagnosi di BMD (1) (Fig.3).



**Figura 3.** Effetto delle mutazioni nel gene della distrofina in un paziente con distrofia muscolare di Becker (BMD) e in un paziente con distrofia muscolare di Duchenne (DMD). Colonna di sinistra, colorazione di ematossilina ed eosina. Colonna di destra, colorazione in microscopia a immunofluorescenza con un anticorpo specifico per la distrofina.

## **2.5 Follow-up clinico- strumentale**

Il follow-up del paziente DMD prevede un approccio multidisciplinare che coinvolge diverse figure professionali necessarie per il pronto riscontro di eventuali complicanze e per l'avvio dei necessari provvedimenti terapeutici. Recentemente sono state aggiornate ed ampliate le raccomandazioni per gestione cardiaca, polmonare, nutrizionale, endocrinologica, riabilitativa, fisiatrica e ortopedica, sulle vaccinazioni e sull'utilizzo dei glucocorticoidi orali (14,20,21).

Per monitorare la progressione dell'ipostenia muscolare, negli ultimi 10 anni sono stati messi a punto numerosi test funzionali, fondamentali per determinare la progressione di malattia e la risposta a trattamenti:



- misure di outcome motorio

- test temporizzati: tempo impiegato a salire e scendere 4 gradini; tempo impiegato per rialzarsi dalla posizione supina; tempo impiegato a percorrere 10 metri correndo; 6-Minute Walking Test (6-MWT) (22);
- test che valutano la funzione motoria globale: North Star Ambulatory Assessment (NSAA) e Performance of the Upper Limb (PUL) (23–25);

- prove di funzionalità respiratoria

- capacità vitale forzata (FVC, forced vital capacity),
- volume espiratorio massimo nel 1° secondo (FEV1, forced expiratory volume in the 1st second),
- picco di flusso espiratorio (PEF, peak expiratory flow),
- picco di flusso durante la tosse (CPF, cough peak flow).

## **2.6 Terapia**

### **2.6.1 Terapie disponibili**

In Italia, ad oggi, i trattamenti farmacologici approvati per i pazienti con DMD sono i corticosteroidi e l'ataluren. La prima classe di farmaci viene prescritta a tutti i pazienti a prescindere dalla mutazione genetica, mentre l'ataluren è indicato solamente per coloro che presentano mutazioni puntiformi di stop.

#### Corticosteroidi

Il trattamento con corticosteroidi per via orale (prednisone e deflazacort) è attualmente il gold standard per i pazienti affetti da DMD (26). Il dosaggio standard è di 0,75 mg/kg/die per il prednisone e di 0.9 mg/kg/die per il deflazacort.

Trial clinici randomizzati hanno dimostrato che la somministrazione orale di prednisone o deflazacort produce un effetto positivo non solo sulla funzione motoria, ritardando la perdita della deambulazione autonoma, ma anche su quella respiratoria e cardiaca (27–29). Esistono programmi di utilizzo del prednisone che prevedono un dosaggio intermittente (10 giorni on e 10 giorni off). Il trattamento con prednisone giornaliero o deflazacort giornaliero ha determinato un miglioramento in termini di funzione motoria e polmonare rispetto al regime on/off senza alcuna differenza significativa tra i due regimi giornalieri di corticosteroidi (30,31). In linea generale, è raccomandato il loro utilizzo dai 3-4 anni di età e non dovrebbe essere sospeso dopo la perdita della deambulazione, vista l'efficacia anche sull'apparato cardiorespiratorio. Indipendentemente dal tipo di molecola o di dosaggio, gli effetti collaterali a lungo termine sono rappresentati da cataratta, ritardo di crescita e osteopenia/osteoporosi con conseguente aumento delle fratture vertebrali e delle ossa lunghe. Più recentemente, la ricerca si è concentrata su nuovi steroidi, come il vamorolone, che potrebbero fornire un'alternativa migliore riducendo gli effetti avversi associati agli steroidi (32–34).

### Ataluren

Ataluren è una terapia orale indicata per i pazienti affetti da DMD deambulanti a partire dai 2 anni di età (35). È una piccola molecola somministrata per via orale che agisce sulle mutazioni non-senso del DNA, ossia quelle mutazioni che determinano la trasformazione di un codone codificante in un codone di stop. Ataluren rende possibile la lettura dell'mRNA contenente un codone di stop prematuro, come se fosse invece un codone dotato di senso (stop codon readthrough). In questo modo si riesce ad ottenere una distrofina funzionale (36). Diversi trial clinici randomizzati hanno dimostrato caratteristiche di sicurezza e di efficacia di ataluren (37). Il farmaco è stato approvato dall'AIFA nel dicembre

2014 per tutti i DMD deambulanti di età superiore ai 5 anni con mutazioni nonsense sul gene della distrofina, mentre dal luglio 2021 è prescrivibile a partire dai 2 anni di età. La dose raccomandata è di 10 mg/kg di peso corporeo al mattino, 10 mg/kg di peso corporeo a mezzogiorno e 20 mg/kg di peso corporeo alla sera (per una dose giornaliera totale di 40 mg/kg di peso corporeo).

## **2.6.2 Le terapie in corso di sperimentazione**

Negli ultimi anni sono state svolte sperimentazioni di varie molecole, che per convenzione vengono suddivise in base al target terapeutico in:

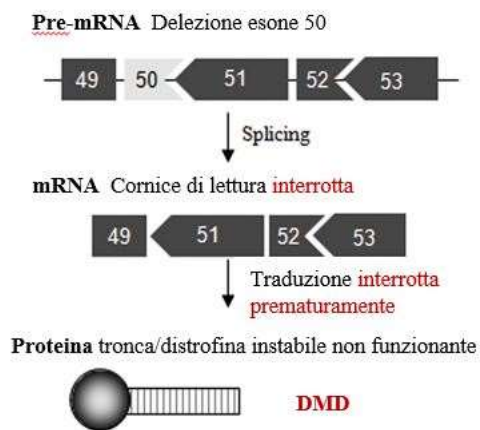
- molecole che hanno lo scopo di ripristinare la produzione di distrofina (exon skipping e terapia genica);
- molecole che agiscono sui difetti secondari al deficit di distrofina stesso (farmaci pro-rigenerativi, farmaci antinfiammatori diversi dagli steroidi, farmaci anti-fibrotici).

### Exon-skipping

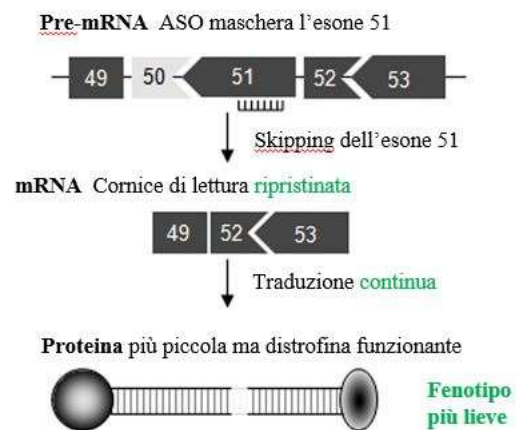
L'exon-skipping è una terapia che si avvale di oligonucleotidi antisenso (ASO), ovvero piccoli segmenti di RNA che si legano a specifici esoni durante lo splicing del pre-mRNA. Il farmaco agisce sull'RNA messaggero rendendolo capace di produrre una proteina, un po' più corta, ma funzionante. Gli ASO vengono somministrati una volta a settimana per via endovenosa in pazienti con delezioni out-of-frame in cui la rimozione di un esone adiacente alla delezione sia in grado di generare una mutazione in-frame. Questo approccio si basa sul fatto che le mutazioni out-of-frame determinano quadri clinici gravi di DMD, mentre le mutazioni in-frame danno quadri più lievi di BMD. Lo scopo è quindi quello di ripristinare la cornice di lettura in modo che possano essere prodotte delle distrofine almeno parzialmente funzionanti (38).

A seconda della sede e della dimensione della mutazione della distrofina, si hanno target differenti in termini di esoni da escludere dalla traduzione. Per questo motivo l'ASO deve essere differente e specifico per poter funzionare su una determinata mutazione. Tra questi citiamo in particolare lo skipping dell'esone 51, del 45, del 53 e del 44. Tra le molecole approvate dalla Food and Drug Administration (FDA) americana vi è l'Eteplirsén, che ha come target lo skipping dell'esone 51, ed è quindi applicabile a circa il 14% dei pazienti DMD. Il Golodirsén e il Viltolarsén, disegnati per lo skipping dell'esone 53, hanno recentemente ottenuto l'approvazione da parte della FDA e sono potenzialmente in grado di ripristinare la proteina distrofina nell'8-10% dei pazienti. Lo skipping di più esoni è stato introdotto nel tentativo di aumentare l'applicabilità di questi farmaci, in particolare questo approccio è potenzialmente in grado di trattare il 90% degli individui con delezioni, l'80% di quelli con duplicazioni e il 98% di quelli che presentano mutazioni non-senso. Sono attualmente in corso studi preclinici per valutarne l'efficacia (39). Al momento l'European Medicines Agency (EMA), sulla base degli studi disponibili, non ritiene che i benefici della commercializzazione di questi farmaci superino i rischi; perciò, in Europa non sono ancora stati approvati. Diversi studi mirati a valutare il beneficio clinico degli ASO sono in corso (1).

## Distrofia muscolare di Duchenne



## Exon skipping



**Figura 4.** Razionale dell'exon skipping. In questo esempio, la delezione dell'esone 50 crea un mRNA out-of-frame e porta alla sintesi di una distrofina tronca non funzionale o instabile (pannello di sinistra). Un oligonucleotide antisense (ASO) diretto contro l'esone 51 può indurre un effettivo skipping dell'esone 51 e ripristinare la cornice di lettura, generando quindi una distrofina più piccola ma parzialmente funzionale (pannello di destra). (Echevarría L. et al, 2018).

## Terapia genica

L'EMA ha approvato per la prima volta una terapia genica (Glybera) per il trattamento del deficit di lipoprotein lipasi nel 2012, successivamente nel 2017 è stato approvato dal FDA il farmaco Luxturna per il trattamento di una patologia retinica congenita, infine nel 2019 è stato approvato dal FDA il farmaco Zolgesma per il trattamento dell'atrofia muscolare spinale (40).

Negli ultimi trent'anni sono stati compiuti enormi sforzi per sviluppare una terapia genica per la distrofia muscolare di Duchenne. Concettualmente, la sostituzione del gene mutato con uno normale curerebbe la malattia. Tuttavia, lo sviluppo di queste terapie ha incontrato notevoli difficoltà a causa delle grandi dimensioni del gene e del fatto che il tessuto muscolare è presente in tutto il corpo. Sono stati quindi messi a punto dei costrutti più corti rispetto alla distrofina endogena in modo che non eccedessero la capacità dei vettori virali e perciò vengono chiamati "mini" o "micro" distrofina (41). I vettori virali utilizzati sono

quelli adeno-associati (AAVs), in particolare i sierotipi AAV9 e AAVrh74 che hanno un elevato tropismo per i muscoli scheletrico e cardiaco (42). Grazie a tecniche di ingegnerizzazione, il materiale genetico non si integra con il DNA dell'ospite, rimanendo in forma "episomale", riducendo la geno-tossicità, ma aumentando il rischio che il materiale genetico modificato venga perso con i successivi cicli di replicazione cellulare. Un'altra problematica di applicabilità a qualsiasi terapia genica è rappresentata dal fatto che un elevato numero dei soggetti potrebbe essere già entrato in contatto con varianti di AVV o adenovirus presenti in natura e avere così sviluppato gli anticorpi o altra forma di immunità cellulo-mediata contro il capsido virale (40). Al momento sono in corso studi per determinare l'efficacia e la sicurezza della terapia genica anche a distanza di anni dalla sua somministrazione (ClinicalTrial.gov: NCT03362502, NCT03769116, NCT0336874).

### **2.6.3 Farmaci che agiscono sui difetti secondari al deficit della distrofina**

Tra le molecole che agiscono sui difetti secondari al deficit di distrofina esistono farmaci pro-rigenerativi, come givinostat, farmaci antinfiammatori diversi dagli steroidi, come vamorolone e farmaci antifibrotici come pamvlevlumab. Queste terapie sono in fase di sperimentazione e sono potenzialmente applicabili a tutti i pazienti affetti da DMD a prescindere dal tipo di mutazione.

Il Givinostat, un inibitore dell'istone deacetilasi (HDAC), enzima costitutivamente attivo nei muscoli DMD, si è visto avere la capacità di ridurre significativamente la fibrosi e promuovere la rigenerazione muscolare nel modello murino (43).

Il vamorolone è un farmaco antinfiammatorio steroideo dissociativo che si lega agli stessi recettori dei corticosteroidi (recettore dei glucocorticoidi, recettore dei mineralocorticoidi), ma presenta una struttura chimica diversa e differente nel meccanismo d'azione. Questo

farmaco riduce al minimo gli effetti collaterali della terapia cronica steroidea, ma mantiene l'inibizione delle vie proinfiammatorie del fattore nucleare  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (44).

Pamvlevlumab è un anticorpo monoclonale diretto contro il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTFG), una proteina che favorisce la deposizione del tessuto fibrotico (45).

#### **2.6.4 Altre terapie**

Nella gestione multidisciplinare dei pazienti DMD sono fondamentali la fisioterapia motoria, la fisioterapia respiratoria, la ventilazione non invasiva, la terapia cardioprotettiva, la terapia anti osteopenia/osteoporosi e la nutrizione per via gastrostomica secondo timing e modalità suggerite dalle più recenti linee guida (14,20,21).

### **3 Coinvolgimento del Sistema Nervoso Centrale nella DMD**

#### ***3.1 I disturbi cognitivo-comportamentali***

Negli ultimi decenni è cresciuta l'attenzione per le alterazioni del neurosviluppo nella Distrofia Muscolare di Duchenne. Diversi studi hanno riportato una riduzione complessiva del quoziente intellettivo (QI) nei pazienti affetti da DMD rispetto ai controlli, con circa il 30% che presenta un deterioramento cognitivo (46–48). Tuttavia le difficoltà di apprendimento e i problemi comportamentali non si sono dimostrati essere presenti in tutti i pazienti con DMD e possono avere diversi gradi di gravità, questo contrasta con la debolezza muscolare che invece caratterizza tutti i pazienti (49). Inoltre i disturbi dell'apprendimento e comportamentali possono riguardare sia pazienti con deficit intellettivo, sia pazienti il cui QI ricade nel range normale-alto (50). Sono inoltre riportate numerose comorbidità, come ad esempio disturbi dello spettro autistico nel 3-15%, ADHD

(attention deficit hyperactivity disorder) nell'11-32%, disturbo ossessivo-compulsivo nel 5-60%, ansia nel 27% ed epilessia nel 6% (51–55).

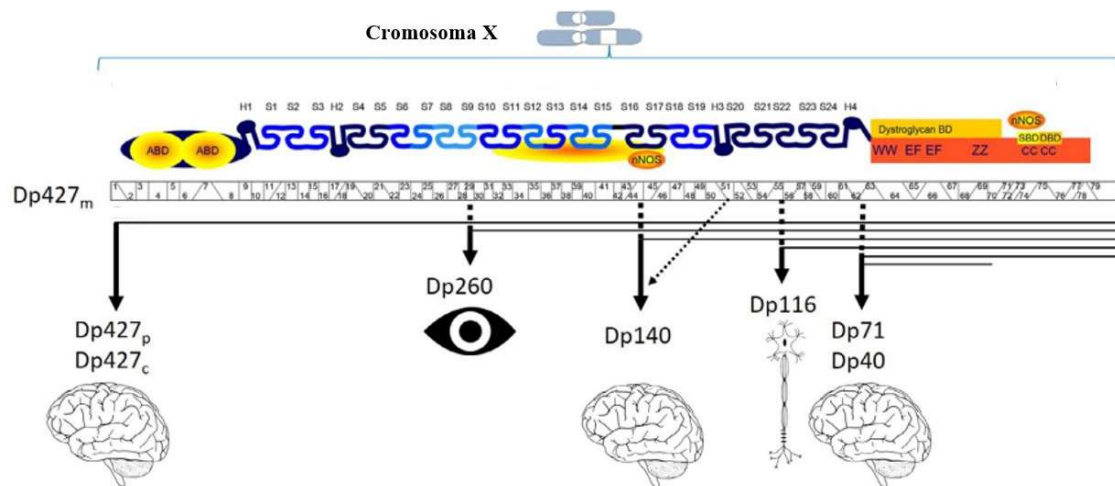
### **3.2 Correlazioni genotipo-fenotipo**

Per valutare i fattori che giocano un ruolo nel determinare il profilo cognitivo dei pazienti con DMD sono state studiate diverse associazioni genotipo-fenotipo.

#### **3.2.1 Relazione tra isoforme della distrofina e coinvolgimento del sistema nervoso centrale**

Il gene della distrofina contiene vari promotori tessuto-specifici che producono differenti isoforme con diverse lunghezze e pattern di splicing. Tre di queste isoforme sono full-length (a lunghezza intera) e derivano da promotori prossimali: la Dp427m muscolo specifica, la Dp427c presente a livello post-sinaptico nella corteccia cerebrale, nell'amigdala, nell'ippocampo e nel cervelletto e Dp427p espressa nelle cellule cerebellari di Purkinje. Oltre a queste esistono altre isoforme più piccole espresse in diversi tessuti e prodotte da quattro siti promotori che sono localizzati tra gli introni più a valle, queste sono: la Dp260 espressa a livello della retina, la Dp140 espressa nella corteccia cerebrale durante lo sviluppo fetale ed in minor misura nel cervelletto durante la vita post-natale, la Dp116 espressa nelle cellule di Schwann, la Dp71 espressa in vari tessuti: cervello, retina, rene, fegato, polmone, cuore, mentre non è espressa nel muscolo scheletrico, infine la Dp40 presente ubiquitariamente a livello encefalico, è ottenuta dallo splicing alternativo del trascritto della Dp71 e sembra avere un ruolo di interazione con alcune proteine presinaptiche (56–58).





**Figura 5.** Struttura del gene distrofina e localizzazione dei promotori tessuto-specifici. (Doorenweerd et al, 2020)

Vi sono studi che hanno cercato di correlare la posizione della mutazione all'interno del gene DMD e l'espressione delle diverse isoforme della distrofina, con il profilo cognitivo dei pazienti. In particolare, le mutazioni più distali del gene DMD, che coinvolgono l'espressione delle isoforme Dp140 e Dp71, sono legate ad un'aumentata incidenza di disabilità intellettiva, deficit nella memoria di lavoro e alterazioni del neurosviluppo rispetto alle mutazioni che coinvolgono solamente l'espressione delle isoforme a lunghezza intera. In particolare l'isoforma Dp140 è altamente espressa nel sistema nervoso centrale, compresa l'amigdala, dal periodo fetale all'infanzia ed è associata a geni coinvolti nel neurosviluppo. In un recente lavoro Hashimoto Y. et al, hanno ipotizzato che l'assenza della Dp140, in aggiunta all'assenza dell'isoforma Dp427, possa esacerbare le alterazioni comportamentali caratteristiche dei disturbi dello spettro autistico e alterare la trasmissione GABAergica e glutammatergica in modelli murini. Hanno infatti dimostrato, in modelli murini, che l'assenza della Dp140 è associata a problemi comportamentali e a una ridotta

trasmissione glutammatergica. Inoltre, in questo studio si è osservato che le alterazioni comportamentali nei topi sono migliorate dal ripristino parziale di Dp140 (59).

E' comunque da considerare che i problemi comportamentali ed emozionali sono presenti nei pazienti con mutazioni sia prossimali che distali e non è ancora chiaro se vi sia un singolo prodotto del gene DMD responsabile del fenotipo cognitivo (58,60).

### **3.2.2 Relazione tra aspetto neuropatologico e fenotipo cognitivo**

Esistono diversi studi condotti post-mortem su cervelli di soggetti affetti da DMD. Rosman et al hanno confrontato tre pazienti con diagnosi di DMD e deficit intellettivo con un gruppo di controllo di pazienti con DMD senza deficit intellettivo evidenziando diverse anomalie cerebrali associate al fenotipo cognitivo, in particolare i pazienti con deficit cognitivo avevano un peso cerebrale inferiore e un maggiore spessore corticale, con un minor numero di neuroni, una scarsa stratificazione e alterazioni microscopiche (61). Tuttavia studi successivi hanno dimostrato l'assenza di una chiara relazione tra abilità cognitive e aspetto istologico (62,63). Si può concludere quindi che il coinvolgimento cerebrale nella Distrofia Muscolare di Duchenne non è uniforme, seppure sia possibile identificare delle anomalie istologiche nei singoli pazienti (64).

### **3.2.3 Relazione tra genotipo e fenotipo neuroradiologico**

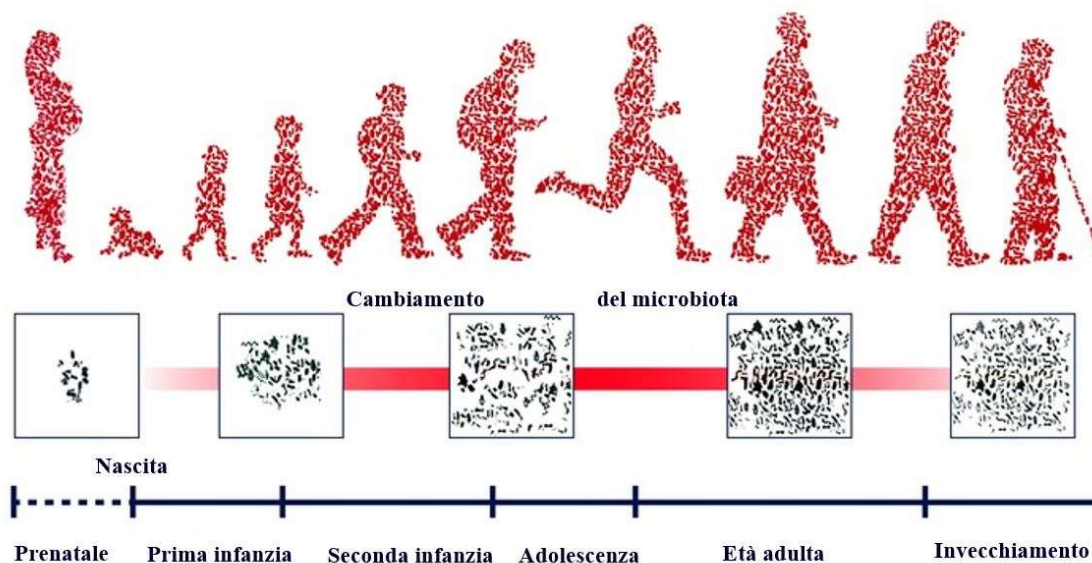
Un'altra associazione che è stata indagata riguarda invece quella tra il genotipo e fenotipo neuroradiologico. E' stato documentato che, non solo i pazienti con deficit dell'isoforma Dp427, ma anche dell'isoforma Dp140 sembrerebbero avere ridotto volume della sostanza grigia e ridotta perfusione cerebrale, anche se il dato di ridotta perfusione cerebrale nei pazienti con DMD può essere legato ad altri meccanismi come ad esempio la funzione

cardiaca e la mobilità limitata (64). Inoltre è stata studiata la risonanza magnetica funzionale, in particolare il default mode network (DMN) che è attivato durante il riposo e soppresso durante lo svolgimento di un preciso compito cognitivo; in alcuni dei pazienti con DMD vi è un'iperconnettività di questo network rispetto ai controlli, questo esita in una maggiore deattivazione dell'attività cerebrale durante lo svolgimento di un compito, analogamente a quanto avviene nel disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD) (65).

#### **4 Il microbiota intestinale**

Il corpo umano ospita trilioni di cellule microbiche la cui azione coordinata è ritenuta importante per la vita umana. Queste popolazioni di cellule microbiche raggiungono la loro massima densità nel compartimento intestinale, dove formano una comunità microbica complessa, nota come microbiota intestinale (66). Il microbiota intestinale umano è composto principalmente da batteri, con *Firmicutes* e *Bacteroidetes* come *phyla* dominanti, seguiti da *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobiota* (67–70).

Diversi studi hanno trovato un'associazione tra disturbi neuropsichiatrici e neurodegenerativi e alterazioni della composizione dei microrganismi intestinali e dei loro prodotti metabolici, ponendo l'attenzione sul cosiddetto asse intestino-cervello (71). In particolare la ricerca si sta occupando di capire come i microrganismi influenzino il sistema nervoso centrale attraverso la loro capacità di produrre e modificare fattori metabolici, immunologici e neurochimici nell'intestino (72). Le comunità batteriche intestinali sono entità che possono cambiare sia nella composizione che nell'attività nel corso della vita e in risposta a fattori legati all'ospite, come l'età e la genetica, e a fattori ambientali, primi fra tutti la dieta e i farmaci (73–75).



**Figura 6.** Cambiamento dinamico del microbiota nel corso della vita. (Cryan and Dinan, J Physiology 2017)

Tuttavia, non è ancora chiaro se i cambiamenti nella composizione del microbiota siano la causa o la conseguenza dei disturbi cerebrali, poiché è stato recentemente suggerito che il cervello potrebbe influenzare il microbiota in una complessa relazione bidirezionale (76,77).

#### **4.1 L'asse microbiota-intestino-cervello**

Il microbiota intestinale può potenzialmente influenzare, direttamente e indirettamente, il sistema nervoso centrale utilizzando diverse vie di comunicazione, in particolare attraverso l'attivazione del sistema immunitario (ad esempio citochine infiammatorie e chemochine), la produzione di neurotrasmettitori (ad esempio serotonina, acido gamma-aminobutirrico [GABA] e glutammato), di acidi grassi a catena corta (SCFA) e di aminoacidi chiave della dieta come triptofano (TRP) e i suoi metaboliti (78,79). Inoltre, il microbiota intestinale può agire sulla permeabilità della barriera intestinale, con l'aumento dei livelli circolanti di lipopolisaccaride (LPS) (80), modulando i livelli del fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF) e alterando l'asse neuroendocrino (ipotalamo-ipofisi-surrene) e la via di

comunicazione neuronale (ad esempio, afferenze del vago, sistema nervoso enterico) (81). D'altra parte, il cervello influisce sulla peristalsi intestinale, sulla funzione sensoriale e di secrezione, principalmente attraverso il nervo vago.

#### ***4.2 Il ruolo del microbiota nelle patologie neuropsichiatriche***

La maggior parte dei disturbi neuropsichiatrici nei bambini e negli adulti sono considerate patologie multifattoriali, scatenate da fattori ambientali in individui geneticamente suscettibili. Recenti evidenze suggeriscono che la disbiosi e l'alterata permeabilità intestinale giochino un ruolo patogenetico permettendo l'ingresso di molecole potenzialmente neurotossiche nel flusso sanguigno e attivando sistema immunitario in modo anomalo (82). Alcuni studi clinici hanno dimostrato che i pazienti affetti da disturbi neuropsichiatrici come i disturbi dello spettro autistico, la schizofrenia, il disturbo depressivo maggiore, l'epilessia, le malattie di Alzheimer e Parkinson o la sclerosi multipla, potrebbero presentare alterazioni del microbiota intestinale e dell'asse microbiota-intestino-cervello, ma se questo sia direttamente correlato o proporzionale alla gravità dei disturbi non è ancora stato chiarito. Sono necessari ulteriori studi clinici e preclinici per identificare specificamente e contrastare la disregolazione dell'asse microbiota-intestino-cervello. Il vantaggio è che il microbiota è più accessibile e modificabile del genoma umano, fornendo potenzialmente nuove opportunità per prevenire o trattare i disturbi neuropsichiatrici (83). La possibilità di utilizzare i probiotici nella prevenzione o nel trattamento delle malattie neurologiche sta diventando un argomento di grande interesse, tuttavia ad oggi non esistono né linee guida né indicazioni chiare sul loro utilizzo (84).

### 4.3 *La metagenomica*

Per descrivere la varietà del microbiota intestinale ci si avvale della metagenomica, cioè lo studio del microbioma, ovvero del genoma del microbiota. Ad oggi ci sono due tecniche principali utilizzate per l'analisi delle comunità microbiche mediante Next Generation Sequencing (NGS): il sequenziamento del 16S rRNA e la tecnica *shotgun*. La prima è in grado di indagare la popolazione batterica del microbiota, attraverso il sequenziamento genomico del 16S rRNA, un gene dell'rRNA specifico per ogni batterio che serve a produrre i ribosomi, responsabili della sintesi proteica. Si tratta di un gene particolarmente utile per valutare la composizione di una comunità microbica, grazie alla presenza di regioni del gene che sono conservate tra i microbi e che fungono da bersaglio per i primer di amplificazione, unitamente ad un'ampia serie di dati di sequenze di rRNA disponibili per il confronto (85). La tecnica di analisi metagenomica *shotgun* consiste, invece, nel sequenziamento del DNA batterico isolato dall'intera comunità microbica. Le letture di sequenziamento ottenute vengono successivamente analizzate utilizzando come riferimento le banche dati di metagenomica, con l'obiettivo di assegnare ogni lettura di sequenziamento ad una categoria tassonomica specifica (taxa). Il sequenziamento 16S è generalmente ritenuto efficace e fornisce informazioni sufficienti sulla composizione delle comunità microbiche, a partire da un numero relativamente piccolo di sequenze per campione. Tuttavia, una delle principali limitazioni di questo metodo è che i taxa sono assegnati sulla base della sequenza di una sola regione del genoma batterico. Inoltre, la scelta dei primer utilizzati per amplificare l'rRNA è fondamentale, in quanto alcuni primer hanno dimostrato di avere un bias che porta a una sovrarappresentazione o a una sottorappresentazione di taxa specifici (86). D'altro canto, l'analisi *shotgun* richiede una maggiore copertura (10-30 milioni di letture) e un'analisi dei dati più complessa. Tuttavia, raccogliendo informazioni su ampie regioni genomiche, questa tecnica permette una

definizione più accurata delle specie, fornendo così una descrizione più dettagliata della comunità batterica (87).

#### 4.4 *Bristol Stool Scale*

Uno strumento utile nell'analisi del microbiota intestinale è la *Bristol Stool Scale*. Quest'ultima è uno strumento medico diagnostico, usato sia in ambito clinico sia sperimentale, creato allo scopo di classificare in categorie la forma e consistenza delle feci umane; la scala prevede sette categorie distinte. I primi due tipi indicano un grado più o meno grave di stipsi, dovuta all'eccessiva permanenza nell'intestino ed alla difficoltà nell'espulsione. Il tipo tre e il tipo quattro indicano quadri di normalità. Anche il quinto tipo è considerato accettabile, purché evacuato con facilità a causa di una scarsità di fibre; il sesto è invece compatibile con un quadro tendente alla diarrea, pienamente riscontrabile nel settimo.



Figura 7. Bristol stool scale

## 5 Materiali e metodi

Questo studio monocentrico osservazionale e trasversale è stato condotto sulla casistica di 53 pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne afferenti all'IRCCS Giannina Gaslini da maggio 2021 a settembre 2022. Sono stati inoltre inclusi nello studio 36 controlli sani.

### Criteri di inclusione:

- Pazienti in studio: diagnosi genetica o istologica di Distrofia Muscolare di Duchenne,
- Controlli: maschi sani di età inferiore a 30 anni.

### Criteri di esclusione:

- assunzione di antibiotici e di immunosoppressori nei precedenti tre mesi,
- assunzione di probiotici nelle precedenti due settimane,
- diete selettive,
- malattie infiammatorie croniche intestinali in comorbidità.

Alla visita di arruolamento sono stati raccolti/misurati/valutati:

- Dati anamnestici. Età, età all'avvio della terapia steroidea e durata della terapia steroidea, età alla perdita della deambulazione, utilizzo della ventilazione non invasiva (NIV) e parametri antropometrici (altezza, peso e BMI).
- Profilo cognitivo. Sono state utilizzate le scale Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence-III (WPPSI-III) per i pazienti di età compresa tra i 2 anni e i 6 anni, Wechsler Intelligence Scale for Children-IV (WISC-IV) per i pazienti di età compresa tra i 6 anni e i 16 anni e 11 mesi e Wechsler Adult Intelligent Scale-IV (WAIS-IV) per i pazienti di età superiore ai 16 anni e 11 mesi. Per i pazienti di età superiore ai 18 anni non è stato delineato il profilo cognitivo. Ciascuna scala è declinata in differenti sottotest che valutano specifici domini



cognitivi e permettono di calcolare un punteggio composito generale (quoziente intellettivo, QI). La disabilità intellettiva è stata definita per valori di QI < 70, secondo le indicazioni del DSM IV-TR.

- Materiale fecale. Per ogni paziente è stato raccolto un campione di feci a cui è stato attribuito un punteggio alla Bristol Stool Scale da parte dei genitori o dei pazienti stessi, e successivamente è stato analizzato per la composizione batterica attraverso il sequenziamento genomico del 16S rRNA presso il laboratorio CeGat a Tübingen, Germania. L'Unità di Bioinformatica Clinica dell'IRCCS Istituto Giannina Gaslini ha analizzato i dati derivati dal sequenziamento del 16S rRNA prima con Kraken2 (88), un metodo classificare le sequenze nelle varie categorie tassonomiche, o taxa (regno, phylum, classe, ordine, famiglia, genere e specie). I taxa assegnati da Kraken2 sono stati analizzati con Bracken (89), un metodo per stimare il numero di reads che originano da ogni specie presente nel campione. A questo scopo è stato impiegato il database pubblico Greengenes (90).

I report Bracken di ciascun paziente sono stati caricati in Pavian (91), un software interattivo per analizzare e visualizzare i risultati di classificazione metagenomica. I risultati del software Pavian sono stati poi elaborati per permetterne l'analisi LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) (92), un indice in grado di determinare le differenze tassonomiche tra diversi campioni messi a confronto, utilizzando l'analisi discriminante lineare (LDA).

### **Analisi statistica**

Dal punto di vista statistico, i dati sono stati espressi come segue:

- le variabili continue sono state espresse come 1°, 2° (mediana) e 3° quartile;
- il confronto tra due gruppi è stato eseguito con test di Mann-Whitney per dati non parametrici e la significatività statistica è stata definita per valori di  $p < 0,05$ . L'analisi è stata effettuata utilizzando GraphPad Prism 8.0.1.

## 6 Risultati

### Dati anamnestici e antropometrici

Lo studio ha coinvolto un totale di 53 pazienti di età compresa tra i 3,0 e 30,2 anni, con età mediana di 14,2 anni (Q1 10,9; Q3 19,8).

I controlli arruolati per questo studio sono 36 maschi sani di età compresa tra i 2,92 e i 27,5 anni, con età mediana di 11,3 anni (Q1 9,15; Q3 16,8).

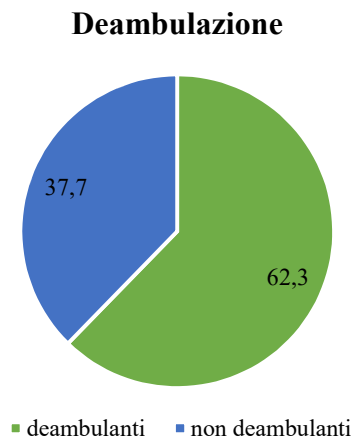
Al momento dell'arruolamento 46/53 pazienti (86,8%) erano in trattamento con deflazacort assunto per via orale, avviato ad una età mediana di 5,5 anni e 7/53 pazienti (13,2%) non avevano mai assunto terapia steroidea. La durata della terapia steroidea aveva una mediana di 7,0 anni (Q1 4,19; Q3 12,3).

	<b>Età (anni)</b>	<b>Età all'avvio dello steroidi (anni)</b>	<b>Durata della terapia steroidica (anni)</b>
<b>N</b>	53	46	45
<b>25° percentile</b>	10.9	4.63	4.19
<b>50° percentile</b>	14.2	5.53	7.07
<b>75° percentile</b>	19.8	6.56	12.3

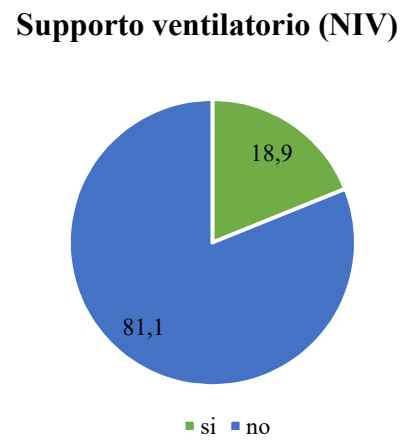
**Tabella 1**

I pazienti deambulanti erano 33/53 (62,3%) mentre i non deambulanti erano 20/53 pazienti (37,7%).

Per quanto riguarda il supporto ventilatorio non invasivo (NIV) 10/53 pazienti (18,9%) avevano avviato un supporto ventilatorio mentre 43/53 pazienti (81,1%) non utilizzano la NIV.



**Grafico 1**



**Grafico 2**

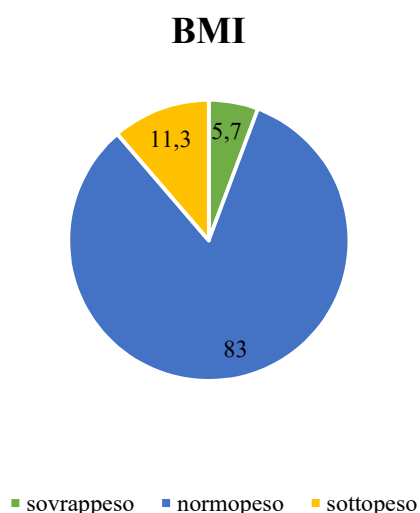
Per la valutazione del BMI, sono state considerate le deviazioni standard (Standard Deviations, SDs) sulla base della definizione stabilita dall'OMS per i pazienti fino ai 19 anni:

- < -2SD, sottopeso
- tra -2 e +2SDs, normopeso
- +2SDs, obesità.

Per i pazienti di età superiore ai 19 anni il BMI patologico, secondo i criteri stabiliti dall'OMS, è stato definito per valori:

- < 18,49, sottopeso
- Tra 18,50 e 24,99 normopeso
- > 25, sovrappeso.

Tre/53 pazienti (5,7%) risultavano sovrappeso, 44/53 pazienti (83%) risultavano normopeso e 6/53 pazienti (11,3%) risultava sottopeso.



**Grafico 3**

Per la caratterizzazione delle mutazioni, abbiamo considerato i 50/53 pazienti con diagnosi genetica di DMD. Per tre pazienti sono ancora in corso le indagini genetico-molecolari, sebbene il quadro clinico sia altamente suggestivo della patologia e il quadro istologico mostri un'evidente carenza di distrofina.

Abbiamo suddiviso i pazienti in tre gruppi sulla base della predizione dell'impatto delle mutazioni sull'espressione delle differenti isoforme della distrofina (93):

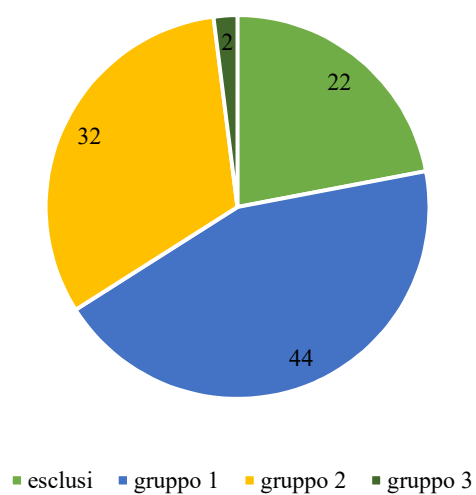
- Gruppo 1: mutazioni che coinvolgono solo la regione che precede l'introne 44;
- Gruppo 2: mutazioni che coinvolgono la regione che va dall'esone 51 all'esone 62 incluso e che non coinvolgono l'esone 63 o la regione che segue l'esone 63;
- Gruppo 3: mutazioni che coinvolgono l'esone 63 e/o la regione che segue l'esone 63.

I pazienti con mutazioni che coinvolgono la zona che va dall'esone 45 all'esone 50 incluso e che non coinvolgono l'esone 51 o la regione che segue l'esone 51 sono stati esclusi a causa della difficoltà nel predire gli effetti di queste mutazioni sull'espressione delle isoforme.

<b>Gruppi</b>	<b>N</b>	<b>Frequenza</b>
Gruppo 1 (fino all'es. 44 incluso):	22/50	44%
Gruppo 2 (dall'es. 51 al 62 incluso):	16/50	32%
Gruppo 3 (dall'es. 63 incluso in poi):	1/50	2%
Esclusi (dall'es. 45 al 50 incluso):	11/50	22%

**Tabella 2**

### Tipizzazione delle mutazioni



**Grafico 4**

### Profilo cognitivo

È stato studiato mediante somministrazione di scale Wechsler. Nella Tab. 3 è indicato il numero di pazienti valutato con le diverse scale, sono disponibili i dati relativi al profilo cognitivo di 34/53 pazienti. Con “NV” sono rappresentati i pazienti “non valutabili”, il cui ritardo cognitivo era tale da non consentire la somministrazione delle scale di valutazione.

<b>Scala utilizzata</b>	<b>N</b>	<b>Legenda:</b>
WPPSI-III	5	WPPSI-III (Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence) : 2 - 6 anni
WISC-IV	23	WISC-IV (Wechsler Intelligence Scale for Children): 6 anni - 16 anni e 11 mesi
WAIS-IV	2	WAIS-IV (Wechsler Adult Intelligence Scale): > 16 anni e 11 mesi
NV	4	NV = non valutabili

**Tabella 3**

Globalmente, le scale di valutazione utilizzate hanno dimostrato che 22/34 pazienti (64,7%) presentavano un profilo cognitivo adeguato all'età e 12/34 (35,3%) avevano una disabilità intellettiva (Tab. 4). I pazienti non valutabili (NV) sono stati considerati come affetti da disabilità intellettiva.

I pazienti con **profilo cognitivo adeguato all'età** sono stati assegnati al gruppo **DMD -** e quelli con **disabilità intellettiva** al gruppo **DMD+**.

<b>Disabilità intellettiva</b>	<b>Totale</b>	<b>Frequenza</b>	<b>WPPSI</b>	<b>WISC</b>	<b>WAIS</b>	<b>NV</b>
<b>DMD -</b>	22	64,7%	3	17	2	0
<b>DMD +</b>	12	35,3%	2	6	0	4

**Tabella 4**

## Materiale fecale

Per 35/53 campioni di feci è stato attribuito un punteggio alla Bristol Stool Scale da parte dei genitori o dei pazienti stessi.

Complessivamente, 14/35 pazienti (40%) presentavano un test di Bristol  $\leq 2$ , ossia un alvo tendenzialmente stitico; altri 17/35 pazienti (48,6%) presentavano un test di Bristol di 3 o 4, definito come normale; 4/35 (11,4%) avevano un test di Bristol  $\geq 5$ , più tendenzialmente diarroico (Grafico 5).

### Bristol stool scale

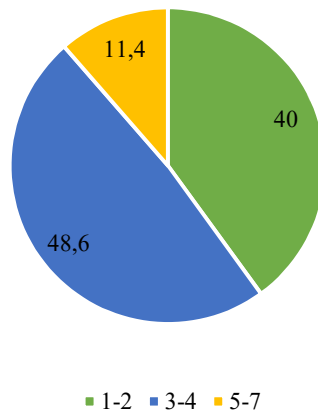


Grafico 5

**Confronto dei dati relativi alle differenti variabili nei soggetti senza (DMD -) e con disabilità intellettiva (DMD+)**

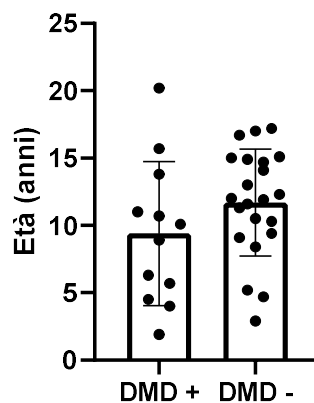
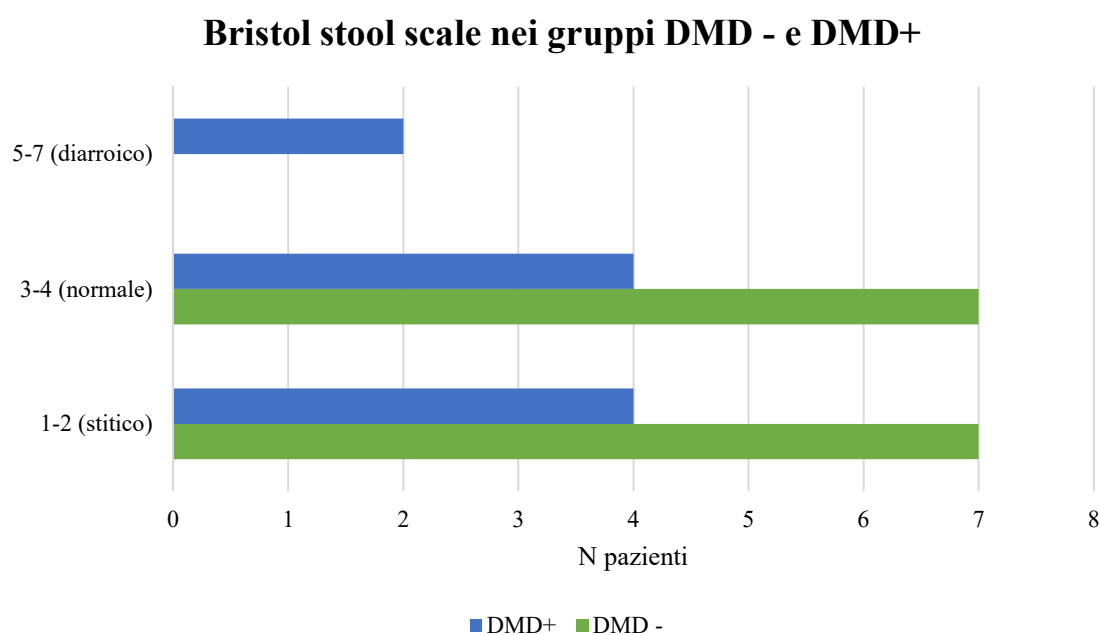


Grafico 6

I gruppi DMD e DMD+ erano omogenei per età (Grafico 6)

Distribuzione dei pazienti DMD e DMD+ nelle 3 categorie della Bristol Stool Scale.



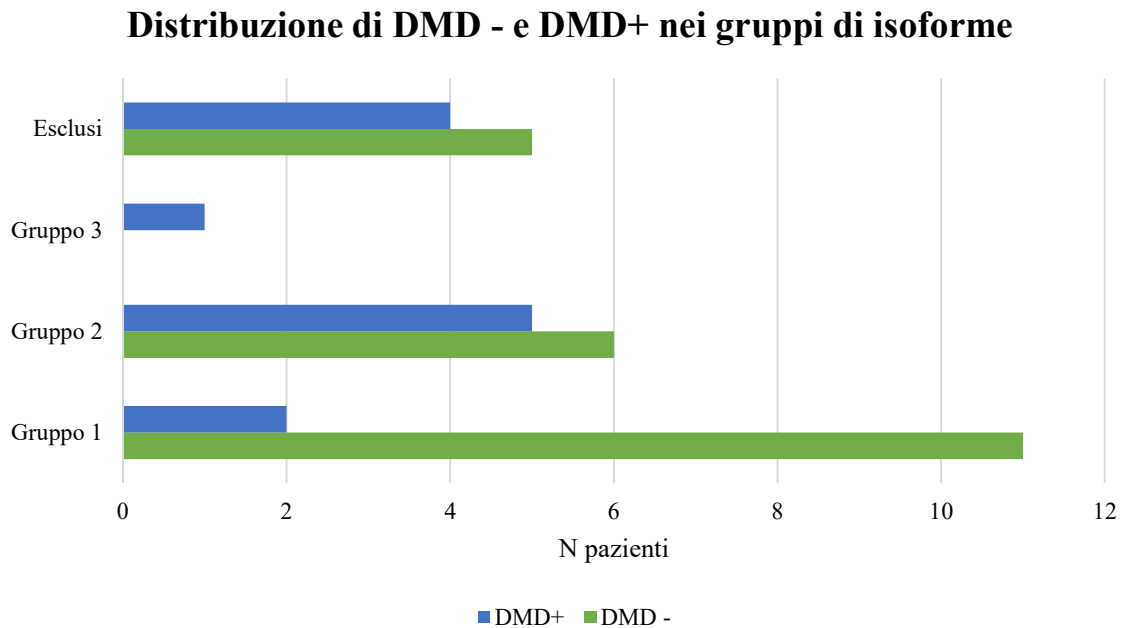
**Grafico 7**

Tra i pazienti cognitivamente adeguati (DMD), 7/14 (50%) avevano un punteggio Bristol pari a 1 o 2, considerato stitico, e 7/14 (50%) avevano un punteggio pari a 3 o 4, considerato normale.

Tra i pazienti con disabilità intellettiva (DMD+), 4/10 (40%) avevano un Bristol pari a 1 o 2, altri 4/10 (40%) avevano un punteggio pari a 3 o 4, 2/10 (20%) aveva un punteggio pari a 5, considerato tendenzialmente diarroico.



Distribuzione dei pazienti DMD e DMD+ nell'ambito dei 3 gruppi identificati sulla base della localizzazione della mutazione e della predizione sulle isoforme della distrofina.



**Grafico 8**

Tra gli 22/34 pazienti senza disabilità intellettiva, 11/22 (50%) appartenevano al Gruppo 1; 6/22 (27,3%) appartenevano al Gruppo 2; nessuno apparteneva al Gruppo 3; 5/22 (22,7%) sono stati esclusi ed in particolare 4 a causa della localizzazione della mutazione e 1 perché privo di diagnosi genetica.

Tra i 12/34 pazienti con disabilità intellettiva, 2/12 (16,7%) apparteneva al Gruppo 1; 5/12 (41,7%) appartenevano al Gruppo 2; 1/12 (8,3%) apparteneva al Gruppo 3; 4/12 (33,3%) sono stati esclusi ed in particolare 3 a causa della localizzazione della mutazione e 1 perché privo di diagnosi genetica.

## Metagenomica

I dati derivati dall'analisi metagenomica, nel gruppo dei DMD e nel gruppo dei controlli, sono stati classificati nelle varie categorie tassonomiche, o taxa (regno, phylum, classe, ordine, famiglia, genere e specie). All'interno dei phyla i più rappresentati sono risultati essere Firmicutes (verde), Bacteroidetes (blu) e Actinobacteria (giallo). Il Grafico 9 riporta i pazienti ordinati da quello con maggior abbondanza relativa di Firmicutes a quello con minor abbondanza. Il Grafico 10 riporta invece le abbondanze relative dei phyla nei controlli.

### Abbondanze relative dei phyla nei DMD

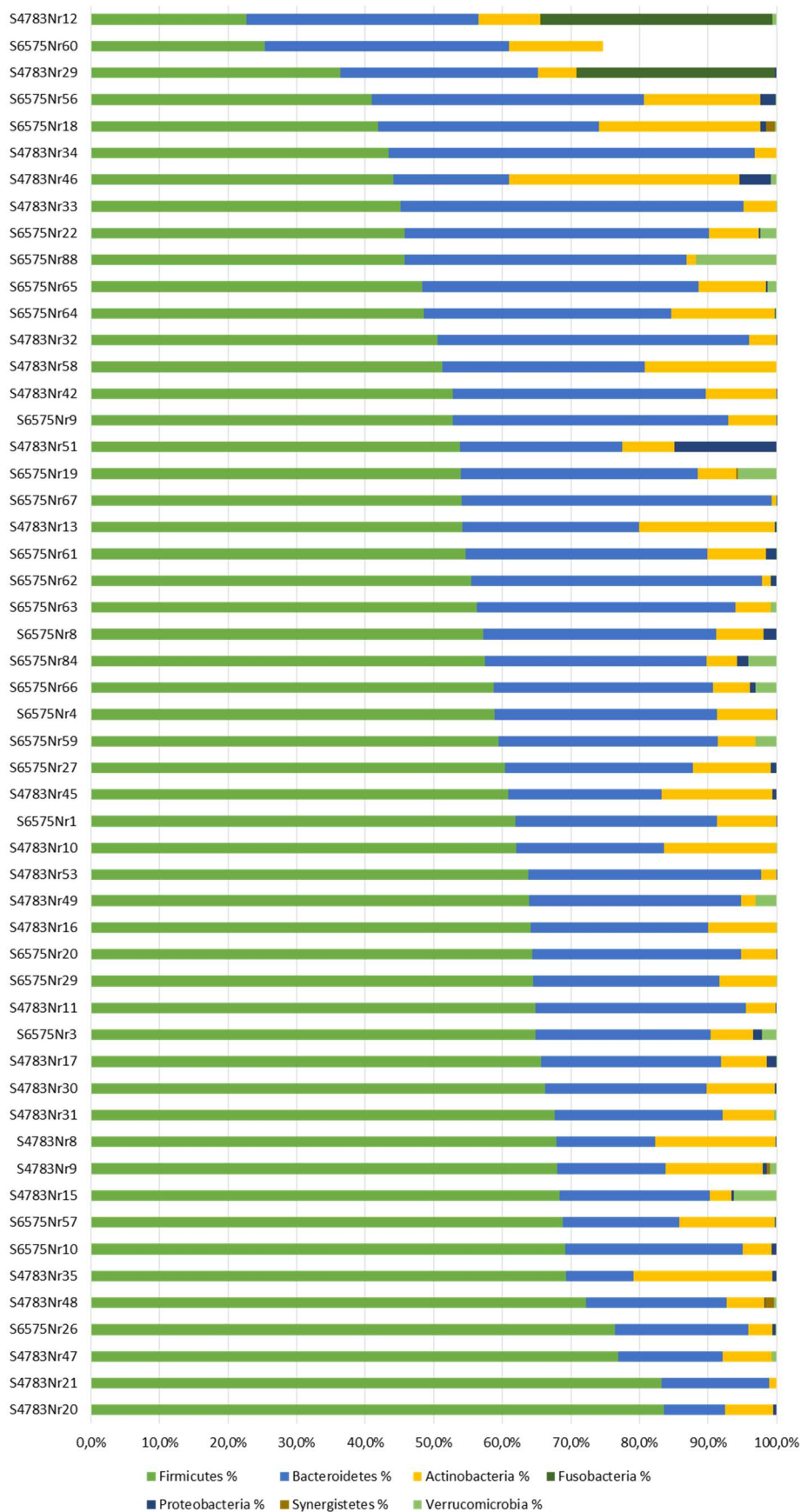


Grafico 9

Abbondanze relative dei phila nei controlli

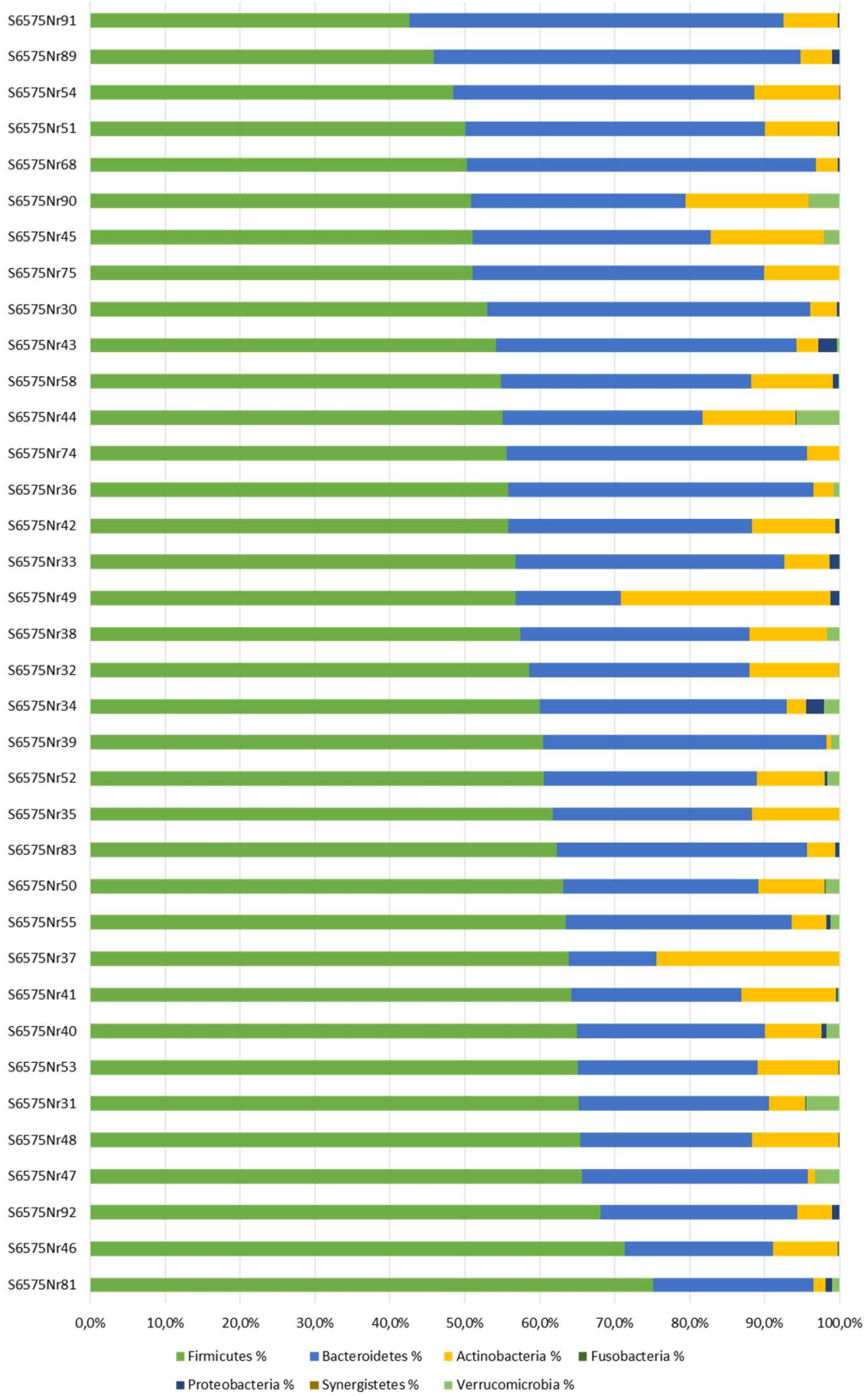


Grafico 10

Del gruppo dei DMD l'abbondanza relativa mediana dei Firmicutes era 58,7%, dei Bacteroidetes era 30,5%, dei Actinobacteria era 8,9% (Grafico 11). Nel gruppo dei controlli l'abbondanza relativa mediana dei Firmicutes era 59,5%, dei Bacteroidetes era 30,7%, dei Actinobacteria era 8,2% (Grafico 12).

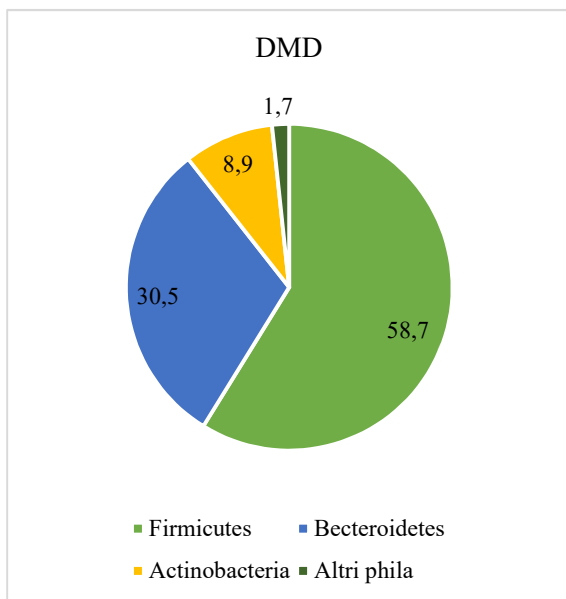


Grafico 11

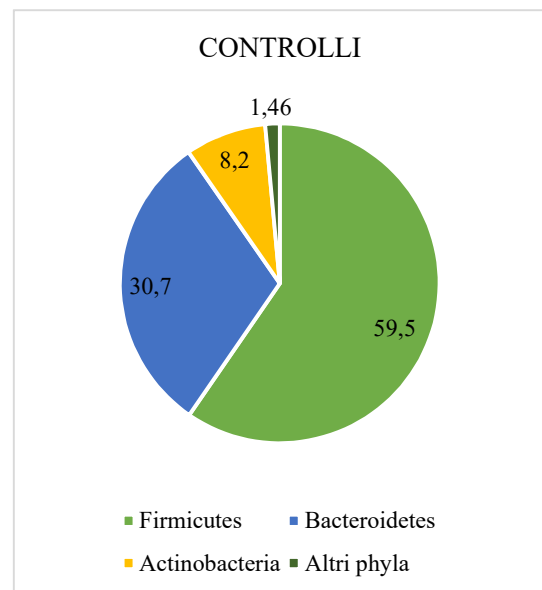
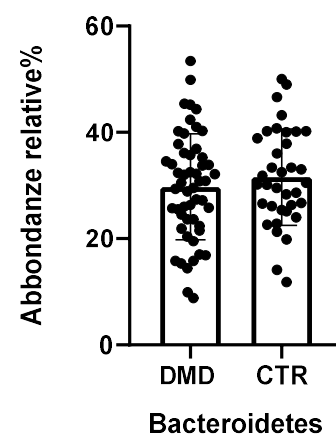
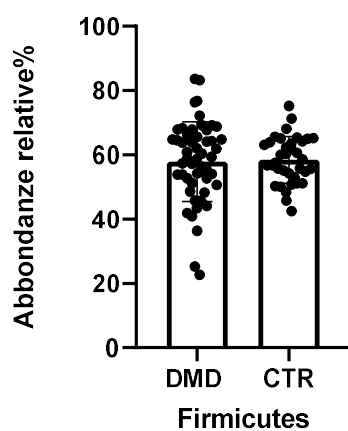


Grafico 12



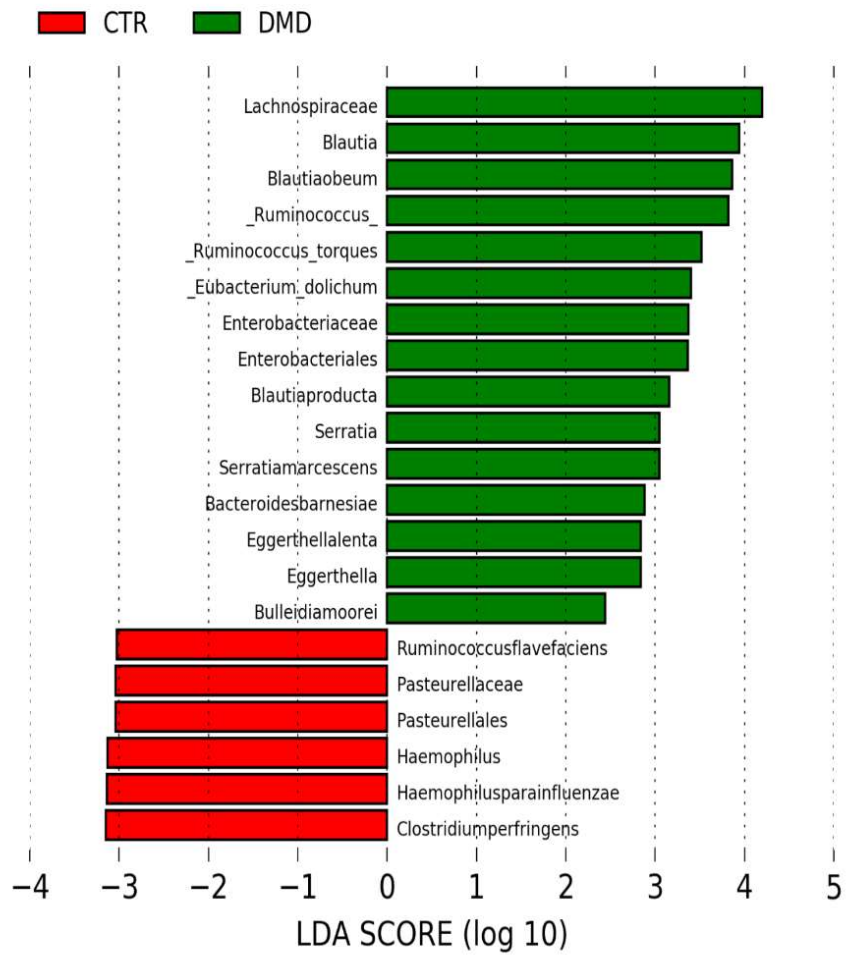


**Grafico 13**

Per quel che riguarda i phyla maggiormente rappresentati nel microbiota umano, non sono state riscontrate differenze significative tra il gruppo DMD e il gruppo dei controlli (Grafico 13).

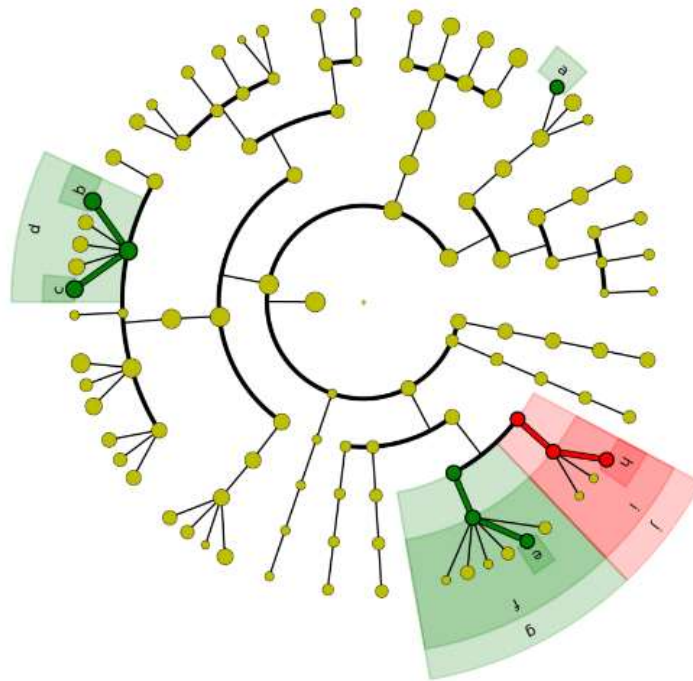
I dati poi sono stati elaborati tramite l'analisi LEfSe. Quest'analisi ha permesso di individuare 15 taxa statisticamente significativamente arricchiti nei DMD e 6 statisticamente significativamente arricchiti nei controlli ( $p < 0.05$ ). (Grafico 14).

A)



B)

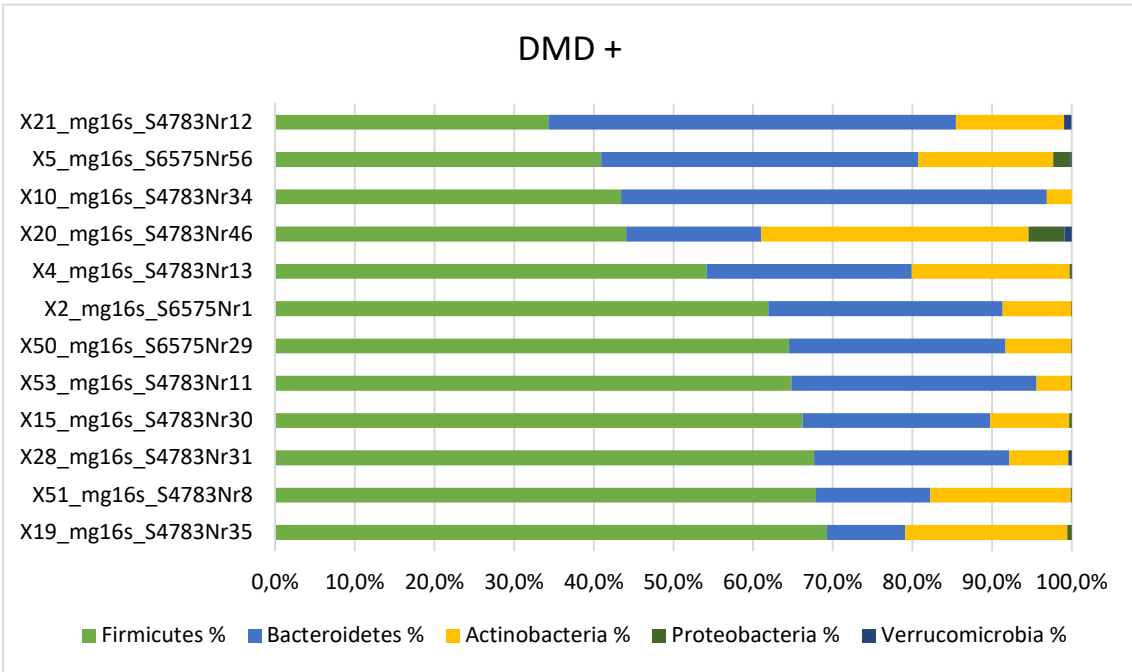
CTR  
DMD



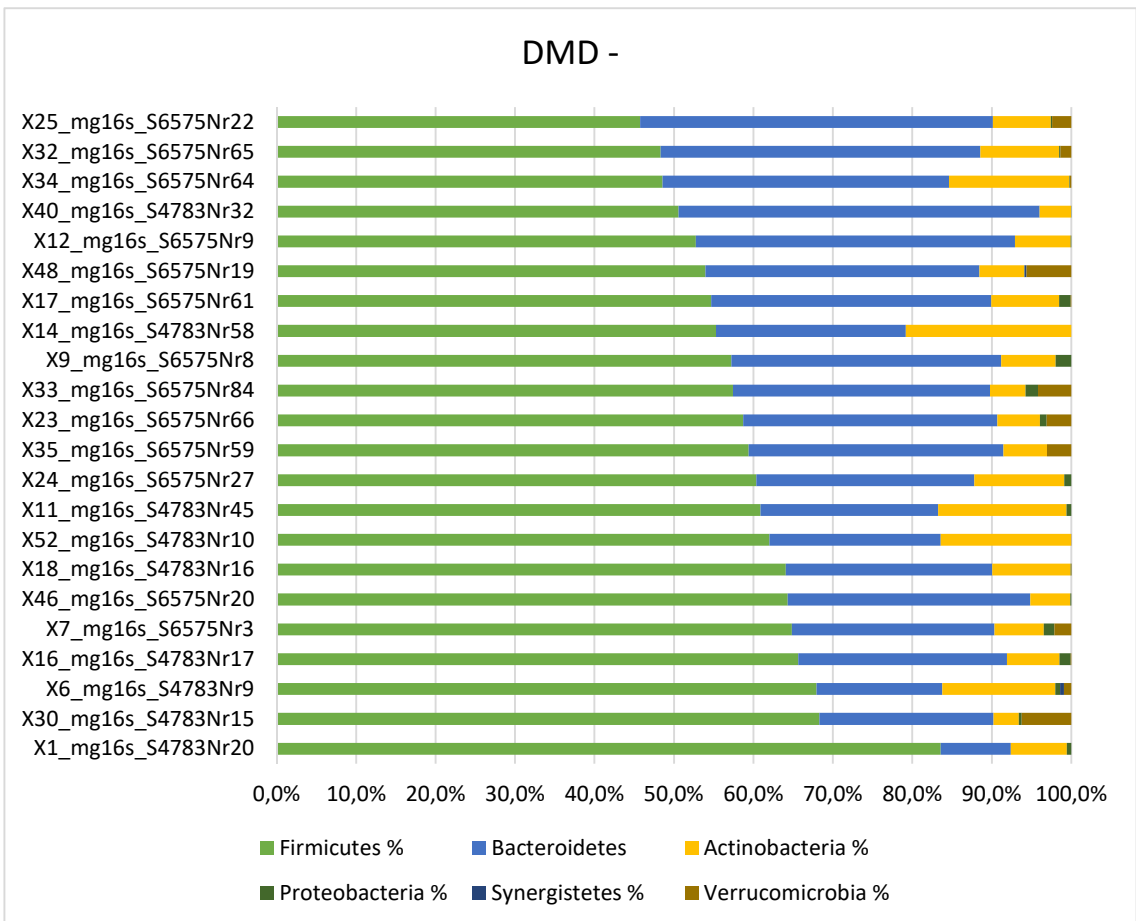
**Grafico 14. A)** Punteggi LDA per i taxa batterici differientemente abbondanti tra i soggetti affetti da distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e controlli (CTR). I punteggi LDA positivi e negativi indicano i taxa batterici arricchiti rispettivamente nei soggetti DMD e controlli. **B)** Cladogramma generato da LEfSe che indica le differenze nei taxa batterici tra soggetti DMD e controlli. I nodi in verde indicano i taxa arricchiti nei DMD rispetto ai controlli, mentre i nodi in rosso indicano i taxa arricchiti nei controlli rispetto ai DMD.

All'interno del gruppo dei DMD, abbiamo messo a confronto i dati di metagenomica dei pazienti affetti da disabilità intellettiva (DMD +) con i dati dei pazienti cognitivamente adeguati (DMD -). Nei Grafici 15 e 16 sono rappresentate le abbondanze relative dei principali phyla rispettivamente del gruppo DMD + e DMD -.





**Grafico 15**



**Grafico 16**

Del gruppo dei DMD + l'abbondanza relativa mediana dei Firmicutes era 55,8%, dei Bacteroidetes era 28,7%, dei Actinobacteria era 14,4% (Grafico 17). Nel gruppo dei DMD - l'abbondanza relativa mediana dei Firmicutes era 60,0%, dei Bacteroidetes era 29,2%, dei Actinobacteria era 8,6% (Grafico 18).

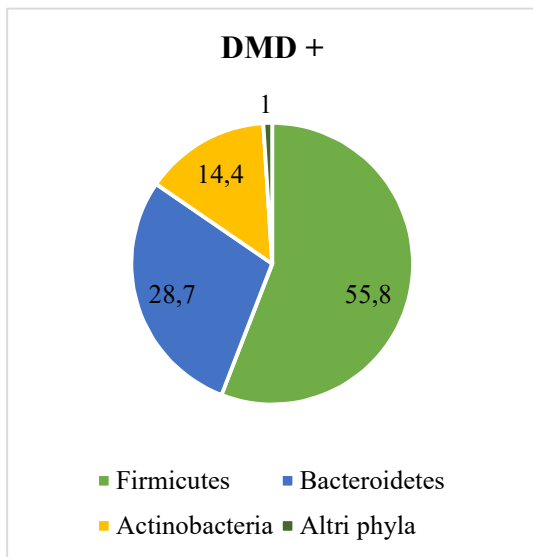


Grafico 17

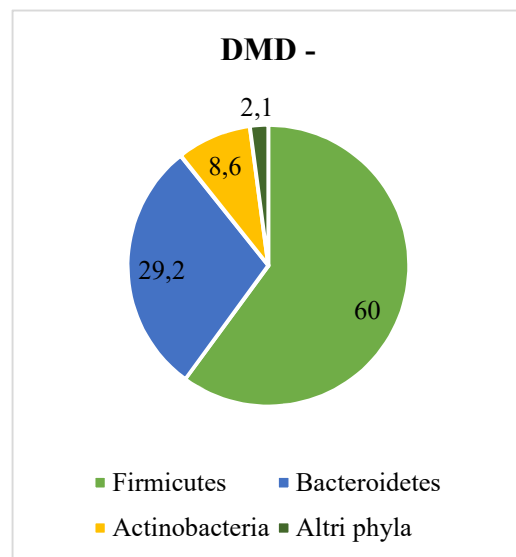
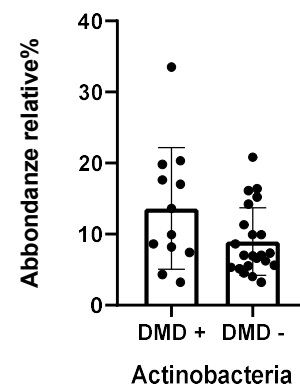
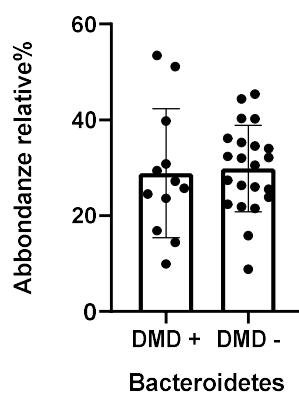
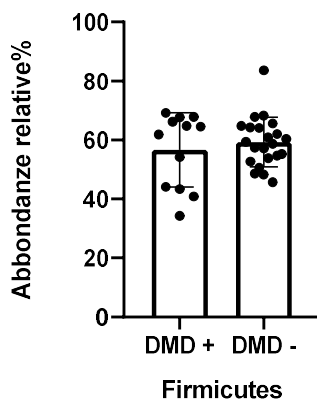
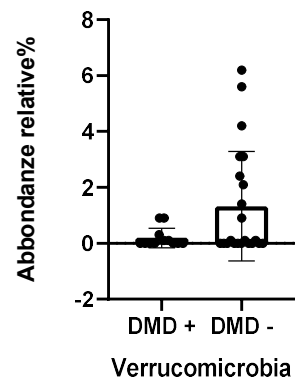
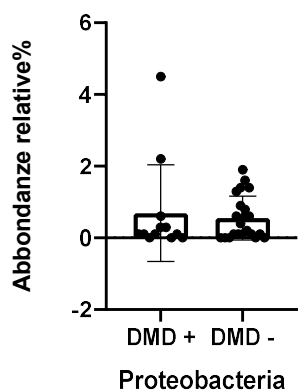


Grafico 18



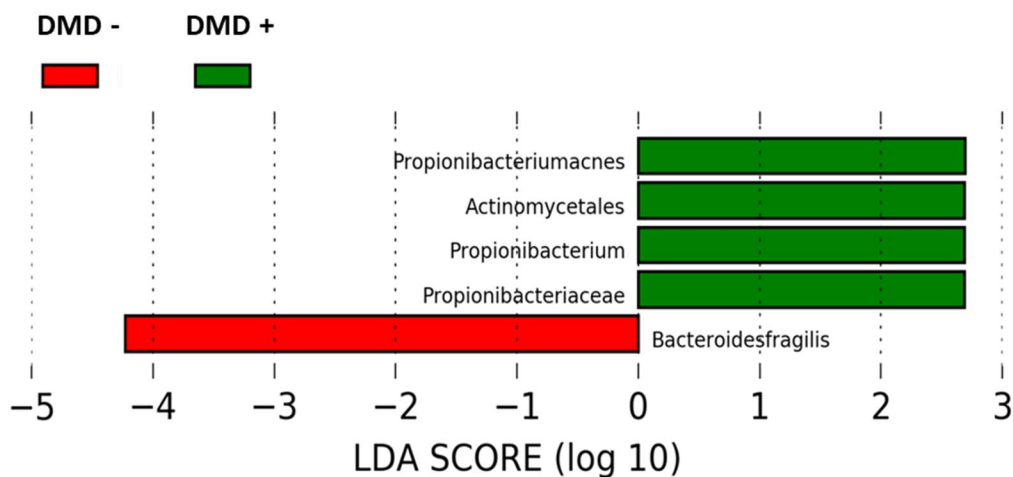


**Grafico 19**

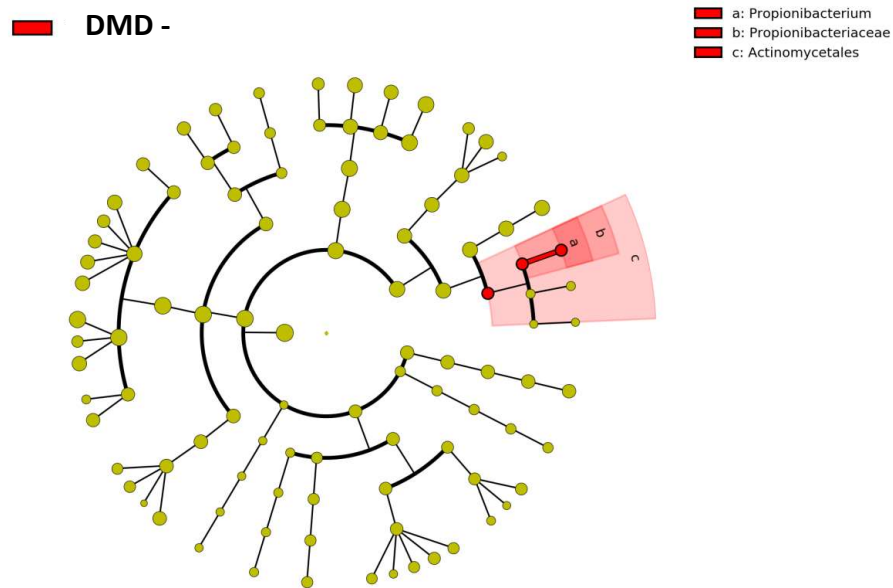
Anche in questo caso, a livello di phyla, non sono state riscontrate differenze significative tra il gruppo DMD + e il gruppo DMD - (Grafico 19).

L'analisi LEfSe ha permesso di individuare 4 taxa statisticamente significativamente arricchiti nei DMD + e 1 significativamente arricchito nei DMD - ( $p < 0.05$ ). (Grafico 20).

A)



B)



**Grafico 20. A)** Punteggi LDA per i taxa batterici differemente abbondanti tra i DMD + e DMD -. I punteggi LDA positivi e negativi indicano i taxa batterici arricchiti rispettivamente nei DMD + e DMD -. **B)** Cladogramma generato da LEfSe che indica le differenze nei taxa batterici tra soggetti DMD + e DMD -. I nodi in rosso indicano i taxa arricchiti nei DMD + rispetto ai DMD-

## 7 Discussione

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare la composizione del microbiota intestinale in pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne con o senza disabilità cognitivo-comportamentale (DMD + e DMD -) con l'intento di valutare l'esistenza di una correlazione tra l'analisi metagenomica del microbiota intestinale e il fenotipo cognitivo di questi pazienti.

In questo studio, inoltre, riportiamo per la prima volta i dati di metagenomica di una coorte di pazienti con DMD confrontandoli con soggetti sani.

In particolare sono stati arruolati 53 pazienti con DMD di età compresa tra i 3,0 e 30,2 anni (età mediana di 14,2 anni) e 36 maschi sani di età compresa tra i 2,92 e i 27,5 anni (età mediana di 11,3 anni).

Nei 34 pazienti con età inferiore ai 18 anni abbiamo determinato il profilo cognitivo utilizzando le scale di Wechsler. La valutazione del profilo cognitivo ha dimostrato che circa il 35% dei soggetti presentava disabilità intellettiva, in linea con quanto riportato in letteratura (46–48).

Relativamente all'analisi del materiale fecale, la Bristol Stool Scale ha evidenziato un quadro di stipsi sia nei DMD- che nei DMD+ con una frequenza del 50% e 40% rispettivamente, dato indicativo di disbiosi (94).

Sia per i pazienti che per i controlli è stato raccolto un campione di feci che è stato analizzato per la composizione batterica attraverso il sequenziamento del 16S rRNA.

I phyla più rappresentati nella nostra coorte, sia nei pazienti che nei controlli non differivano significativamente, i Firmicutes erano il 58,7% e 59,5% rispettivamente, i Bacteroidetes erano il 30,5% e 30,7% rispettivamente e gli Actinobacteria erano il 8,9% e 8,2% rispettivamente.

L'analisi LEfSe ha individuato 15 taxa statisticamente significativamente arricchiti nei DMD e 6 taxa statisticamente significativamente arricchiti nei controlli. I taxa più arricchiti nei DMD appartenevano alla famiglia delle Lachnospiraceae, in particolare il genere *Blautia*, e alla famiglia delle Enterobacteriaceae. Il ruolo delle Lachnospiraceae è a tutt'oggi controverso. Nei soggetti sani, infatti si ritiene che, grazie alla produzione di metaboliti come il butirrato dall'idrolisi di amido e zuccheri, concorrano al controllo dei processi infiammatori nell'intestino, tuttavia in letteratura è riportato un aumento dell'abbondanza delle Lachnospiraceae nel lume intestinale dei soggetti con sindrome metabolica, il diabete, l'obesità, la steatosi epatica patologie infiammatorie croniche intestinali e nei pazienti con disturbo depressivo maggiore e sclerosi multipla (95). Il genere *Blautia*, risulta essere associato a bassi livelli di acido indol-3-propionico (IPA). Quest'ultimo deriva dal metabolismo del triptofano, uno dei nove aminoacidi essenziali, ed è il principale regolatore della barriera e del transito intestinale. Uno studio condotto in vitro, ha dimostrato che l'IPA migliora la funzione della barriera intestinale ottimizzando il funzionamento delle tight junctions, la produzione di mucina

e il secreto delle cellule caliciformi dell'intestino, controllando al contempo la produzione di citochine infiammatorie (96).

Tra i taxa più significativamente arricchiti nei DMD troviamo, inoltre, la famiglia delle Enterobacteriacee. L'eccessiva crescita dei batteri appartenenti a questa famiglia, nelle malattie infiammatorie croniche intestinali, determina un aumento in circolo di citochine pro-infiammatorie come IL-6, IL-17 e il fattore di necrosi tumorale (TNF)-alfa, che attivano le cellule Th17 e Th1 coinvolte nella risposta infiammatoria. E' stata evidenziata inoltre, una diminuzione delle tight junctions e un conseguente un aumento della permeabilità della mucosa intestinale (97).

Ipotizziamo che l'insieme di questi fattori, in particolare l'aumento dell'abbondanza del genere *Blautia* con la consensuale riduzione dell'IPA e l'aumento delle Enterobacteriacee, possa determinare un alterato funzionamento della barriera mucosa intestinale facilitando l'immissione in circolo di molecole infiammatorie che, attraverso la barriera intestinale danneggiata, attivano monociti, linfociti T Th17 e linfociti B, i quali circolando nel sangue possono andare a modulare il sistema immunitario a livello muscolare e peggiorare il fenotipo distrofico nei pazienti affetti da DMD . Un recente lavoro ha dimostrato, nel topo mdx (modello murino della DMD), che il trapianto fecale eubiotico è in grado di ridurre la risposta immunitaria a livello intestinale e a livello muscolare, con un consensuale miglioramento delle caratteristiche distrofiche del muscolo (98).

Anche nel confronto tra i phyla maggiormente rappresentati dei pazienti DMD con e senza disabilità cognitivo comportamentale non vi erano differenze significative nei due gruppi. Tuttavia con l'analisi LefSE abbiamo identificato 4 taxa statisticamente significativamente arricchiti nei DMD + e 1 significativamente arricchito nei DMD -. I 4 taxa più arricchiti nei pazienti DMD con deficit cognitivo appartengono alla famiglia delle Propionibacteriacee, batteri produttori di acido propionico (PPA). Quest'ultimo è un acido grasso a catena corta

prodotto dalla fermentazione dei carboidrati indigeribili, principalmente da parte delle Propionibatteriacee e Clostridiacee. Livelli aumentati di PPA a livello encefalico, possono essere associati a ritardo del neurosviluppo e ad alcune patologie neurologiche, tra cui l'autismo (99). Diverse evidenze suggeriscono che l'autismo potrebbe essere associato alla neuroinfiammazione derivante da un'aumentata sensibilità allo stress ossidativo (100).

L'acido propionico passa facilmente attraverso le membrane lipidiche, inclusa la barriera intestinale e la barriera emato-encefalica, determinando a livello encefalico un aumento dello stress ossidativo, alterazioni della funzione mitocondriale, metabolica e immunitaria. In uno studio effettuato su modelli murini, dopo la somministrazione di PPA, l'analisi biochimica del tessuto cerebrale ha evidenziato un aumento dei markers di stress ossidativo (ed es. perossidazione lipidica e carbonilazione proteica) mentre l'analisi istologica ha rivelato la presenza di astrociti reattivi e attivazione della microglia, indicativi di neuroinfiammazione. Inoltre clinicamente i topi presentavano iperattività, movimenti anomali e ripetitivi e convulsioni (100).

Nei pazienti con DMD le alterazioni comportamentali spesso, come anche nella nostra coorte, possono avere caratteristiche sovrapponibili a quelle proprie dei disturbi dello spettro autistico e dell'ADHD (attention deficit hyperactivity disorder). In questi pazienti, l'aumento dell'abbondanza della famiglia delle Propionibatteriacee può essere, quindi, un fattore di rischio per lo sviluppo di alterazioni comportamentali.

Infine, il *Bacteroides fragilis*, specie significativamente più abbondante nei pazienti DMD cognitivamente adeguati, risulta essere un produttore di acetato e di acido gamma-amminobutirrico (GABA). Il GABA non passa la barriera ematoencefalica, tuttavia i metaboliti derivati dalla fermentazione di carboidrati da parte del microbiota, come l'acetato, possono attraversare la barriera emato-encefalica ed essere incorporati nel ciclo metabolico del GABA andando a potenziare l'azione dei neuroni GABAergici e di conseguenza partecipando al

mantenimento dell'equilibrio tra neuroni eccitatori e inibitori. In letteratura è riportato che la disregolazione di alcuni neurotrasmettitori, tra cui il GABA, può promuovere lo sviluppo di patologie neurologiche, come ad esempio l'autismo (101).

Si può quindi supporre che l'aumento dell'abbondanza del *Bacteroides fragilis* nei pazienti cognitivamente adeguati possa avere un ruolo protettivo nello sviluppo delle comorbilità cognitive e comportamentali tipiche dei pazienti con distrofia muscolare di Duchenne e deficit intellettivo.

In conclusione, i dati derivati dall'analisi metagenomica indicano una diversa composizione del microbiota intestinale sia tra i pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne e i controlli, sia tra i pazienti con profilo cognitivo adeguato all'età e i pazienti con deficit intellettivo, non a livello di phyla, ma a livello di famiglia, genere o specie.

Ai fini di supportare l'ipotesi che l'alterazione della barriera intestinale possa determinare l'immissione in circolo di molecole infiammatorie che vanno a peggiorare il fenotipo clinico dei pazienti con DMD, è in corso lo studio di citochine e cellule infiammatorie circolanti.

Questi dati preliminari andranno poi confermati attraverso studi di metabolomica per valutarne l'eventuale alterata concentrazione nel siero, feci e urine, e per meglio comprenderne l'azione a livello sistemico e le loro vie metaboliche, in particolare nel muscolo e nell'encefalo.

In futuro una più approfondita conoscenza del microbiota e dei suoi metaboliti, potrebbe aiutare a sviluppare strategie terapeutiche efficaci che utilizzino la dieta o i prebiotici per modificare il fenotipo di questi pazienti.



## 8 Bibliografia

1. Duan D, Goemans N, Takeda S, et al. Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers* 2021;19.
2. Bruno C, Panicucci C. Le nuove terapie per la SMA e la Distrofia Muscolare di Duchenne. *Il Pediatra*. 2022.
3. Crisafulli S, Sultana J, Fontana A, et al. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15:141.
4. Mercuri E, Bönnemann CG, Muntoni F. Muscular dystrophies. *The Lancet*. 2019;394:2025–38.
5. Ricotti V, Mandy WPL, Scoto M, et al. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev Med Child Neurol*. 2016;58:77–84.
6. Passamano L, Taglia A, Palladino A, et al. Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. *Acta Myol* 2012;31:121-5.
7. Landfeldt E, Thompson R, Sejersen T, et al. Life expectancy at birth in Duchenne muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2020;35:643–53.
8. Birnkrant DJ, Ararat E, Mhanna MJ. Cardiac phenotype determines survival in Duchenne muscular dystrophy: Survival in Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatr Pulmonol*. 2016;51:70–6.
9. Buddhe S, Cripe L, Friedland-Little J, et al. Cardiac Management of the Patient With Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatrics*. 2018; 1;142:S72–81.
10. Manning GW, Cropp GJ. The electrocardiogram in progressive muscular dystrophy. *Heart*. 1958; 1;20:416–20.
11. Nigro G, Comi LI, Politano L, et al. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol*. 1990;26:271–7.
12. Kovick RB, Fogelman AM, Abbasi AD, et al. Echocardiographic evaluation of posterior left ventricular wall motion in muscular dystrophy. *Circulation*. 1975;52:447–54.
13. Birnkrant DJ, Bello L, Butterfield RJ, et al. Cardiorespiratory management of Duchenne muscular dystrophy: emerging therapies, neuromuscular genetics, and new clinical challenges. *Lancet Respir Med*. 2022;10:403–20.
14. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol*. 2018;17:251–67.
15. de Freitas Nakata KC, da Silva Pereira PP, Salgado Riveros B. Creatine kinase test diagnostic accuracy in neonatal screening for Duchenne Muscular Dystrophy: A systematic review. *Clin Biochem*. 2021;98:1–9.

16. Falzarano M, Scotton C, Passarelli C, et al. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules*. 2015; 7;20:18168–84.
17. Flanigan KM. Duchenne and Becker Muscular Dystrophies. *Neurol Clin*. 2014;32:671–88.
18. Waldrop MA, Flanigan KM. Update in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol*. 2019;32:722–7.
19. Ohlendieck K, Swandulla D. Complexity of skeletal muscle degeneration: multi-systems pathophysiology and organ crosstalk in dystrophinopathy. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 2021;473:1813–39.
20. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol*. 2018;17:347–61.
21. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan. *Lancet Neurol*. 2018;17:445–55.
22. McDonald CM, Henricson EK, Han JJ, et al. The 6-minute walk test in Duchenne/Becker muscular dystrophy: longitudinal observations. *Muscle Nerve*. 2010;42:966–74.
23. Mercuri E, McDonald C, Mayhew A, et al. International workshop on assessment of upper limb function in Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2012;22:1025–8.
24. Mazzone ES, Vasco G, Palermo C, et al. A critical review of functional assessment tools for upper limbs in Duchenne muscular dystrophy: Review. *Dev Med Child Neurol*. 2012;54:879–85.
25. Mayhew A, Mazzone ES, Eagle M, et al. Development of the Performance of the Upper Limb module for Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol*. 2013;55:1038–45.
26. Gloss D, Moxley RT, Ashwal S, et al. Practice guideline update summary: Corticosteroid treatment of Duchenne muscular dystrophy: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2016; 2;86:465–72.
27. Mendell JR, Moxley RT, Griggs RC, et al. Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne’s muscular dystrophy. *N Engl J Med*. 1989 15;320:1592–7.
28. Griggs RC, Moxley RT, Mendell JR, et al. Duchenne dystrophy: randomized, controlled trial of prednisone (18 months) and azathioprine (12 months). *Neurology*. 1993;43:520–7.
29. Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, et al. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. Cochrane Neuromuscular Group, editor. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; CD003725.

30. Guglieri M, Bushby K, McDermott MP, et al. Effect of Different Corticosteroid Dosing Regimens on Clinical Outcomes in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2022;327:1456.
31. Biggar WD, Skalsky A, McDonald CM. Comparing Deflazacort and Prednisone in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis*. 2022;9:463–76.
32. Li X, Conklin LS, den Anker J, et al. Exposure-Response Analysis of Vamorolone (VBP15) in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy. *J Clin Pharmacol*. 2020;60:1385–96.
33. Hoffman EP, Schwartz BD, Mengle-Gaw LJ, et al. Vamorolone trial in Duchenne muscular dystrophy shows dose-related improvement of muscle function. *Neurology*. 2019;93:e1312–23.
34. Conklin LS, Damsker JM, Hoffman EP, et al. Phase IIa trial in Duchenne muscular dystrophy shows vamorolone is a first-in-class dissociative steroidal anti-inflammatory drug. *Pharmacol Res*. 2018;136:140–50.
35. Mercuri E, Muntoni F, Osorio AN, et al. Safety and effectiveness of ataluren: comparison of results from the STRIDE Registry and CINRG DMD Natural History Study. *J Comp Eff Res*. 9:341–60.
36. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*. 2007;447:87–91.
37. McDonald CM, Muntoni F, Penematsa V, et al. Ataluren delays loss of ambulation and respiratory decline in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy patients. *J Comp Eff Res*. 2022;11:139–55.
38. Niks EH, Aartsma-Rus A. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther*. 2017;17:225–36.
39. Dzierlega K, Yokota T. Optimization of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther*. 2020;27:407–16.
40. Elangkovan N, Dickson G. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. Jaiswal J, Nagaraju K, editors. *J Neuromuscul Dis*. 2021;8:S303–16.
41. Duan D. Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther*. 2018;26:2337–56.
42. Manini A, Abati E, Nuredini A, et al. Adeno-Associated Virus (AAV)-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy: The Issue of Transgene Persistence. *Front Neurol*. 2022;12:814174.
43. Bettica P, Petrini S, D’Oria V, et al. Histological effects of givinostat in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2016;26:643–9.
44. Guglieri M, Clemens PR, Perlman SJ, et al. Efficacy and Safety of Vamorolone vs Placebo and Prednisone Among Boys With Duchenne Muscular Dystrophy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*. 2022;79:1005–14.

45. Yang Z, Li W, Song C, et al. CTGF as a multifunctional molecule for cartilage and a potential drug for osteoarthritis. *Front Endocrinol.* 2022;13:1040526.
46. Cotton S, Voudouris NJ, Greenwood KM. Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Dev Med Child Neurol.* 2001;43:497-501.
47. Cotton SM, Voudouris NJ, Greenwood KM. Association between intellectual functioning and age in children and young adults with Duchenne muscular dystrophy: further results from a meta-analysis. *Dev Med Child Neurol.* 2005;47:257–65.
48. Wingeier K, Giger E, Strozzi S, et al. Neuropsychological impairments and the impact of dystrophin mutations on general cognitive functioning of patients with Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas.* 2011;18:90–5.
49. Banihani R, Smile S, Yoon G, et al. Cognitive and Neurobehavioral Profile in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy. *J Child Neurol.* 2015;30:1472–82.
50. Battini R, Chieffo D, Bulgheroni S, et al. Cognitive profile in Duchenne muscular dystrophy boys without intellectual disability: The role of executive functions. *Neuromuscul Disord NMD.* 2018;28:122–8.
51. Hendriksen JGM, Vles JSH. Are males with Duchenne muscular dystrophy at risk for reading disabilities? *Pediatr Neurol.* 2006 Apr;34:296–300.
52. Hendriksen JGM, Vles JSH. Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive--compulsive disorder. *J Child Neurol.* 2008;23:477–81.
53. Pane M, Messina S, Bruno C, et al. Duchenne muscular dystrophy and epilepsy. *Neuromuscul Disord NMD.* 2013;23:313–5.
54. Pane M, Scalise R, Berardinelli A, et al. Early neurodevelopmental assessment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD.* 2013;23:451–5.
55. Vicari S, Piccini G, Mercuri E, et al. Implicit learning deficit in children with Duchenne muscular dystrophy: Evidence for a cerebellar cognitive impairment? *PloS One.* 2018;13:e0191164.
56. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003;2:731–40.
57. Waite A, Brown SC, Blake DJ. The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends Neurosci.* 2012 Aug;35:487–96.
58. Michael Naidoo, Karen Anthony. Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Neurobiol* 2020;57.
59. Hashimoto Y, Kuniishi H, Sakai K, et al. Brain Dp140 alters glutamatergic transmission and social behaviour in the mdx52 mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Prog Neurobiol.* 2022;216:102288.

60. Ricotti V, Mandy WPL, Scoto M, et al. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev Med Child Neurol*. 2016;58:77–84.
61. Rosman NP, Kakulas BA. Mental deficiency associated with muscular dystrophy. A neuropathological study. *Brain J Neurol*. 1966;89:769–88.
62. Dubowitz V, Crome L. The central nervous system in Duchenne muscular dystrophy. *Brain J Neurol*. 1969;92:805–8.
63. Jagadha V, Becker LE. Brain morphology in Duchenne muscular dystrophy: a Golgi study. *Pediatr Neurol*. 1988;4:87–92.
64. Doorenweerd N. Combining genetics, neuropsychology and neuroimaging to improve understanding of brain involvement in Duchenne muscular dystrophy - a narrative review. *Neuromuscul Disord NMD*. 2020;30:437–42.
65. Doorenweerd N, de Rover M, Marini-Bettolo C, et al. Resting-state functional MRI shows altered default-mode network functional connectivity in Duchenne muscular dystrophy patients. *Brain Imaging Behav*. 2021;15:2297–307.
66. Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2017;81:e00036-17.
67. Almeida A, Mitchell AL, Boland M, et al. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*. 2019;568:499–504.
68. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016;352:560–4.
69. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489:220–30.
70. Korpela K. Diet, Microbiota, and Metabolic Health: Trade-Off Between Saccharolytic and Proteolytic Fermentation. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2018;9:65–84.
71. Konjevod M, Nikolac Perkovic M, Sáiz J, et al. Metabolomics analysis of microbiota-gut-brain axis in neurodegenerative and psychiatric diseases. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;194:113681.
72. Morais LH, Schreiber HL 4th, Mazmanian SK. The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19:241-255
73. de la Cuesta-Zuluaga J, Kelley ST, Chen Y, et al. Age- and Sex-Dependent Patterns of Gut Microbial Diversity in Human Adults. *mSystems*. 2019;4:e00261-19.
74. David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505:559–63.
75. Vich Vila A, Collij V, Sanna S, et al. Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nat Commun*. 2020;11:362.

76. Pistollato F, Sumalla Cano S, Elio I, et al. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutr Rev.* 2016;74:624–34.
77. Obrenovich MEM. Leaky Gut, Leaky Brain? *Microorganisms.* 2018;6:107.
78. Blander JM, Longman RS, Iliev ID, et al. Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nat Immunol.* 2017;18:851–60.
79. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13:701–12.
80. Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol.* 2017;18:2.
81. Farzi A, Fröhlich EE, Holzer P. Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. *Neurotherapeutics.* 2018;15:5-22.
82. Morris G, Fernandes BS, Puri BK, et al. Leaky brain in neurological and psychiatric disorders: Drivers and consequences. *Aust N Z J Psychiatry.* 2018;52:924–48.
83. Iannone LF, Preda A, Blottière HM, et al. Microbiota-gut brain axis involvement in neuropsychiatric disorders. *Expert Rev Neurother.* 2019;19:1037–50.
84. Umbrello G, Esposito S. Microbiota and neurologic diseases: potential effects of probiotics. *J Transl Med.* 2016;14:298.
85. Young VB, Schmidt TM. Overview of the gastrointestinal microbiota. *Adv Exp Med Biol.* 2008;635:29-40.
86. Rintala A, Pietilä S, Munukka E, et al. Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. *J Biomol Tech JBT.* 2017;28:19–30.
87. Laudadio I, Fulci V, Palone F, et al. Quantitative Assessment of Shotgun Metagenomics and 16S rDNA Amplicon Sequencing in the Study of Human Gut Microbiome. *OMICS J Integr Biol.* 2018;22:248–54.
88. Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 2019;20:257.
89. Lu J, Breitwieser FP, Thielen P, et al. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Comput Sci.* 2017;3:e104.
90. McDonald D, Price MN, Goodrich J, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 2012;6:610–8.
91. Breitwieser FP, Salzberg SL. Pavian: interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinforma Oxf Engl.* 2020;36:1303–4.
92. Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12:R60.

93. Chesshyre M, Ridout D, Hashimoto Y, et al. Investigating the role of dystrophin isoform deficiency in motor function in Duchenne muscular dystrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2022;13:1360–72.
94. Ohkusa T, Koido S, Nishikawa Y, et al. Gut Microbiota and Chronic Constipation: A Review and Update. *Front Med*. 2019;6:19.
95. Vacca M, Celano G, Calabrese FM, et al. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*. 2020;8:573.
96. Li J, Zhang L, Wu T, et al. Indole-3-propionic Acid Improved the Intestinal Barrier by Enhancing Epithelial Barrier and Mucus Barrier. *J Agric Food Chem*. 2021;69:1487–95.
97. Baldelli V, Scaldaferrri F, Putignani L, et al. The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms*. 2021;9:697.
98. Farini A, Tripodi L, Villa C, et al. Microbiota dysbiosis influences immune system and muscle pathophysiology of dystrophin-deficient mice. *EMBO Mol Med* 2022:e16244
99. Lobzhanidze G, Lordkipanidze T, Zhvania M, et al. Effect of propionic acid on the morphology of the amygdala in adolescent male rats and their behavior. *Micron*. 2019;125:102732.
100. Macfabe D, Cain D, Rodriguezcapote K, et al. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: Possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res*. 2007;176:149–69.
101. Chen Y, Xu J, Chen Y. Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders. *Nutrients*. 2021;13:2099.