

MEDICAL

I n t e r n a t i o n a l

R E V I E W

Anno XXV - n. 1/2021 - Reg. del Trib. di Roma n. 488 dell'8/8/1997 - Periodicità quadrimestrale - ©2021 MEDIZIONI S.r.l.
Direttore Responsabile: Antonio Guastella - Via Monte delle Gioie, 13 - 00199 Roma
Tel. 06.81153040/06.40413168 - Fax. 06.40419131 - medizioni@medizioni.it - www.medizioni.it - Cod. 48/20 - <https://doi.org/10.48265/MIR48-20>
Tutti i diritti sono riservati. Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo (comprese fotocopie), senza il permesso scritto dell'editore
Stampa: GESCOM S.p.A. Strada teverina km 7 (via pian di giorgio 27/29) loc. acquarossa - 01100 Viterbo - Italia
Finito di stampare nel mese di gennaio 2021

MICROBIOTA INTESTINALE ED ORGANISMO IN SALUTE

a cura di Fabio Pace

*Direttore UOC Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva
ASST Bergamo Est - Seriate (BG)*

Microbiota intestinale ed organismo in salute

a cura di **Fabio Pace**

Direttore UOC Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva
ASST Bergamo Est - Seriate (BG)

Negli ultimi quindici anni circa la letteratura medica ci ha fatto riscoprire l'importanza del microbiota intestinale (MI) umano come fattore centrale nel mantenimento dell'omeostasi di *Homo sapiens*. Da questo punto di vista, si può parlare di una delle più importanti rivoluzioni in medicina, confrontabile forse a scoperte fondamentali come quella degli antibiotici o l'identificazione della doppia elica del DNA.

In particolare, è emersa la consapevolezza che il microbiota intestinale, insieme ai vari altri microbioti che ci colonizzano, determina in associazione con l'ospite un super-organismo (olobionte) capace di funzioni, non solo metaboliche, molto complesse che apportano un vantaggio reciproco, mutualistico ai due componenti del consorzio.

Quello che rapidamente stiamo iniziando a capire è che alterazioni sufficientemente persistenti o severe dell'equilibrio del MI possono modificare la fisiologia intestinale e rappresentare la porta di ingresso comune (cosiddetto "common ground") per molti agenti patogeni (1).

Homo sapiens è costituito da circa 10 trilioni (10^{13}) di cellule somatiche (eucariotiche) a loro volta frutto dell'attività di circa 23.000 geni; nel nostro intestino è presente un numero 10 volte maggiore con una risultante di circa 3.000.000 di geni non umani. *Homo sapiens* è quindi in realtà un super-organismo, costituito per oltre il 90% da micro-organismi che lavorano in simbiosi tra loro e con l'organismo ospite. Da un punto di vista evolutivo, tale simbiosi mutualistica, offrendo vantaggi reciproci, si è mantenuta, determinando una co-evoluzione sia di *Homo sapiens* che del suo MI (2).

Struttura del microbiota

Il MI rappresenta una entità molto eterogenea, costituita per circa il 99% da batteri (il rimanente 1% è formato da Archea, funghi, lieviti, virus e protozoi) (3). Molteplici fattori determinano la tipologia e la distribuzione del Microbiota nelle varie sezioni del tubo digerente: ambientali, la dieta, l'uso di farmaci, l'igiene ed altri ancora.

All'interno del canale alimentare, agiscono ulteriori "forze" in grado di influenzare la sua composizione, in particolare la concentrazione di ossigeno, il pH, la presenza di bile (fattori dell'ospite) e la presenza di residui alimentari non digeriti (in particolare le fibre) insieme ad altri prodotti del metabolismo dello stesso MI, come gli acidi grassi a catena corta (4).

Tutti questi fattori portano ad una differenziazione precisa del microbiota (Fig. 1), la cui composizione rimane relativamente stabile (meta-stabile) dopo i primi 3 anni di vita, per tendere poi a divenire meno bio-diversa con l'invecchiamento a causa di fattori che riguardano il processo generale dell'immuno-senescenza (o "inflammaging").

L'organizzazione spaziale in ciascun segmento del canale alimentare si sviluppa lungo l'asse trasversale del lume e da questo alla mucosa: il fattore principale che determina tale stratificazione è la presenza di muco, una struttura formata da glicoproteine organizzate in una rete polimerica che copre tutta la superficie mucosa del canale alimentare, dallo stomaco al colon. Il muco è in generale costituito da 2 strati, uno interno più prossimo alla mucosa,

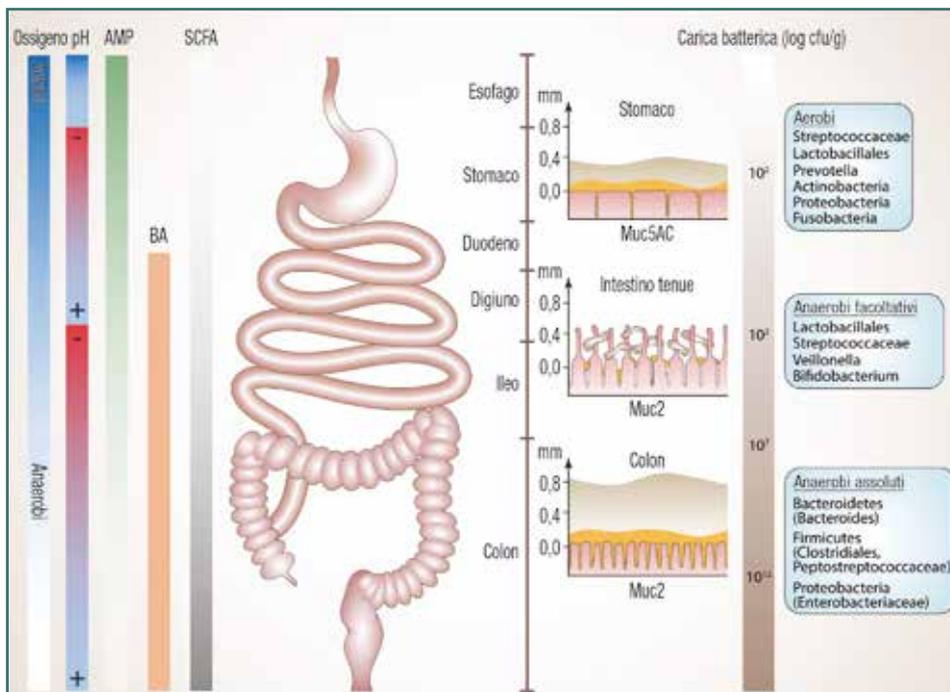


FIGURA 1
Biogeografia e fattori modulanti l'organizzazione spaziale del microbiota intestinale (da Ref. 13).

BA: acidi biliari

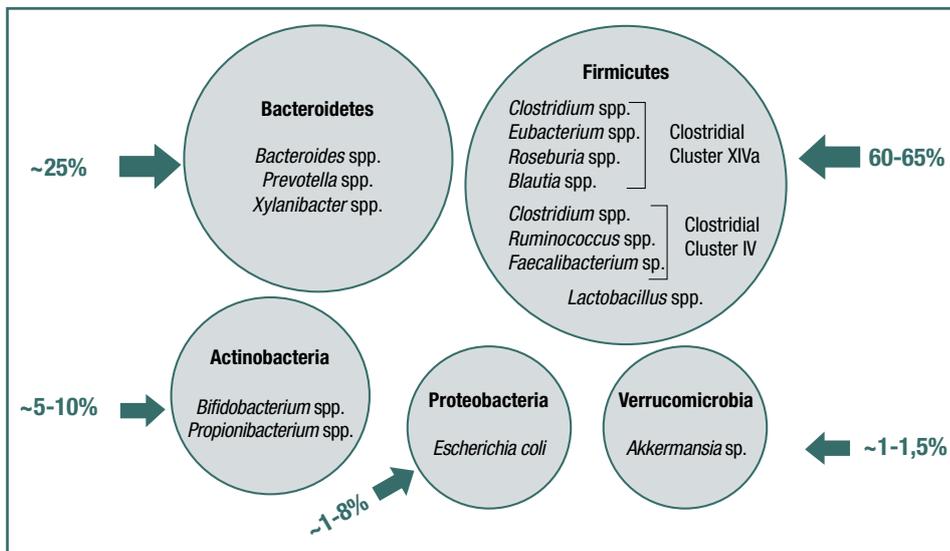


FIGURA 2
Il microbiota colico adulto umano (da Ref. 14).

pressoché sterile, che conferisce una funzione di barriera, meccanica e immune, che preclude il contatto tra i batteri e le cellule epiteliali, ed uno esterno, densamente colonizzato da batteri residenti o in transito. Alcune specie, ad esempio *Akkermansia muciniphila*, fungono da "spazzini" del muco e in particolari condizioni possono degradarlo.

È stato stimato che nell'intestino umano siano presenti sino a 1.000 specie batteriche diverse, anche se in realtà, ad un livello filogenetico superiore (o *phylum*), le divisioni presenti sono solo 5 (Fig. 2): *Firmicutes* (~ 65%), *Bacteroidetes* (~ 25%), *Proteobacteria* (fino all'8%), *Actinobacteria* (~ 5%), e *Verrucomicrobia* (circa 1%) (5).

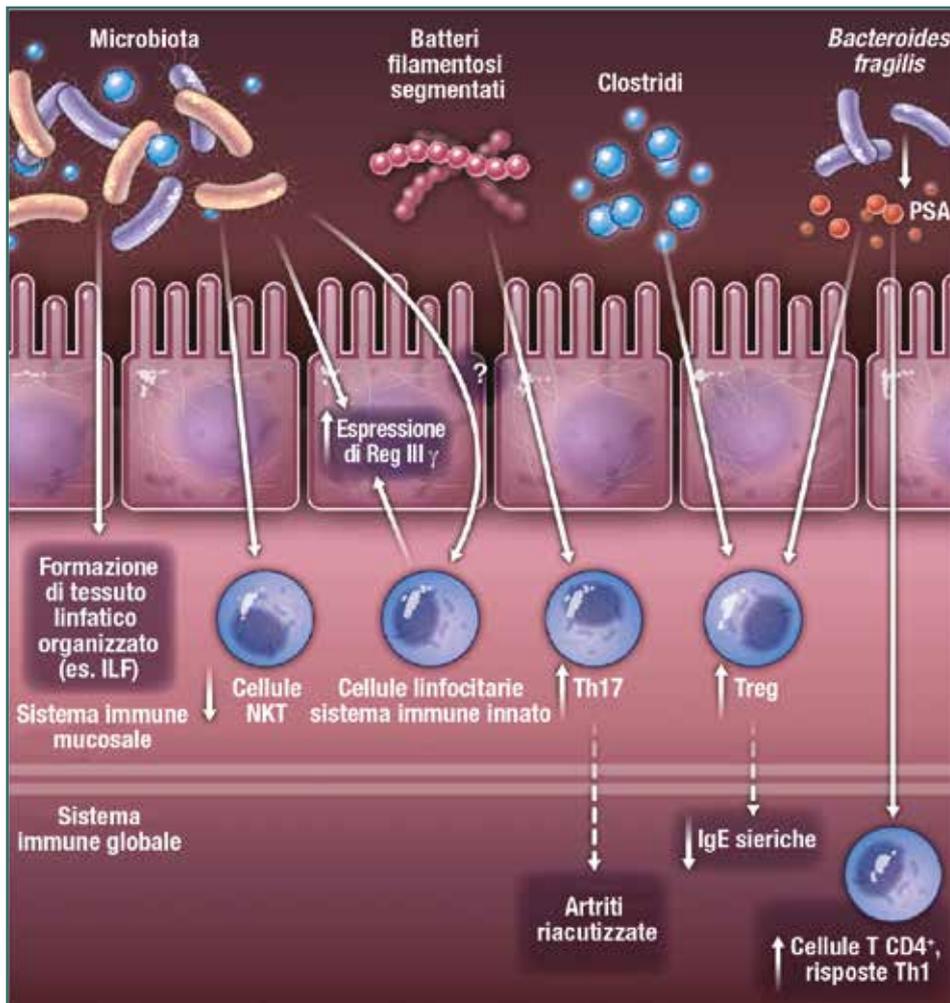
Funzioni del microbiota intestinale

Le funzioni più rilevanti del MI per l'organismo ospite sono:

- barriera alla colonizzazione dei patogeni;
- digestione dei polisaccaridi con produzione di acidi grassi (metabolismo energetico);
- collaborazione con il sistema immune, sia nella sua fase di sviluppo che nella fase successiva per l'ottimizzazione della tolleranza;
- sintesi di vitamine;
- detossificazione degli xenobiotici.

La colonizzazione degli agenti patogeni è contrastata attraverso meccanismi multipli, quali la produzione

di batteriocine (antibiotici naturali), la competizione diretta per i nutrienti, l'adesività alla parete epiteliale. La digestione dei polisaccaridi complessi, prevalentemente contenuti nella parete cellulare di frutta e verdura e resistenti all'assorbimento nel piccolo intestino umano, è una delle funzioni più importanti per la sopravvivenza del MI e contribuisce grandemente all'omeostasi intestinale, poiché un importante prodotto di tale digestione è la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), in particolare il butirrato; tale sostanza ha una funzione trofica fondamentale per le cellule epiteliali coliche e la sua carenza è stata posta in relazione ad una alterazione della regolazione immune intestinale (6).



ILF: follicoli linfatici isolati

FIGURA 3

La figura indica le molteplici vie attraverso le quali il microbiota intestinale è in grado di influenzare la risposta immune dell'ospite, tra cui l'effetto sulla mucosa intestinale e l'immunità sistemica. (da Ref. 7).

La collaborazione col sistema immune (8): il sistema immune gioca, da una parte, un ruolo fondamentale nel mantenere l'omeostasi con la comunità di microbi residenti, garantendo in tal modo la natura mutualistica della relazione microbiota-ospite; dall'altra, i batteri residenti influenzano fortemente l'immunità attraverso molteplici meccanismi, quali lo sviluppo delle strutture linfoidi e della funzione epiteliale, lo "shaping" dei vari subset di linfociti T ed infine, il ruolo sull'immunità sistemica (Fig. 3).

La disbiosi

La rottura dell'omeostasi del MI (in sostanza l'alterazione dell'equilibrio quali-quantitativo della flora microbica intestinale) viene genericamente definita disbiosi. Quest'ultima è legata a cause diverse, tra cui alterazioni patologiche, stress fisici e mentali, carenze nutrizionali, eccessi dietetici con alimentazione di tipo "occidentale", assunzione di farmaci (antibiotici, FANS, terapie steroidee, uso cronico di inibitori di pompa protonica, questi ultimi in grado di innalzare il pH gastrico, favorendo l'ingresso nel piccolo intestino di batteri non presenti in questa sede in condizioni normali).

La disbiosi del MI, condizione spesso sottovalutata e difficile da riconoscere, determina conseguenze negative per la salute dell'ospite con alterazioni che riguardano non soltanto l'apparato gastroenterico ma talvolta l'intero organismo poiché la porta di ingresso di molti microrganismi patogeni che provocano disturbi

cronici non trasmissibili è proprio l'intestino (Tab. I). Nonostante gli enormi progressi realizzati nello studio del Microbiota - ad esempio grazie alle tecniche di identificazione genetica e di studi come lo *Human Microbiome project* - definire la disbiosi è tuttora assai problematico poiché al momento non disponiamo di una definizione di cosa sia un microbiota intestinale normale (3).

Probabilmente, in futuro, la definizione di disbiosi sarà maggiormente legata al concetto di alterazioni funzionali (metaboliche) del MI piuttosto che alle sue variazioni quantitative (8).

Attualmente, volendo semplificare e schematizzare, la disbiosi può realizzarsi attraverso tre diverse dinamiche:

- 1) perdita di microrganismi benefici;
- 2) espansione dei patobionti;
- 3) perdita o riduzione di biodiversità (9) (Fig. 4).

Un esempio della prima situazione è quella che si osserva nelle malattie croniche infiammatorie intestinali (MICI), in cui è stata riportata una riduzione di *Faecalibacterium prausnitzii*, un batterio dotato di vigorosa attività anti-infiammatoria e di *Clostridi del cluster IV*. Nell'IBS (sindrome dell'intestino irritabile) è stata invece osservata una significativa riduzione dei *Bifidobatteri* e della *Prevotella*.

L'esempio più tipico di una espansione di patobionti è il quadro determinato da un aumento di Proteobatteri, in particolare della specie delle Enterobatteriacee tra le quali si annoverano molti ceppi di *Salmonella*,

- Difficoltà nella digestione
- Indebolimento del sistema immunitario
- Presenza di infezioni come cistiti e candidosi
- Alterazione del transito intestinale
- Stitichezza, diarrea, meteorismo o aerofagia
- Spossatezza e mancanza di energia
- Dolori addominali, colon irritabile e dermatiti
- Alitosi e cefalee
- Nervosismo, ansia, disturbi del sonno, stanchezza
- Astenia e cambiamenti dell'umore

TABELLA I

Alcuni tra i più comuni disturbi e sintomi della disbiosi.

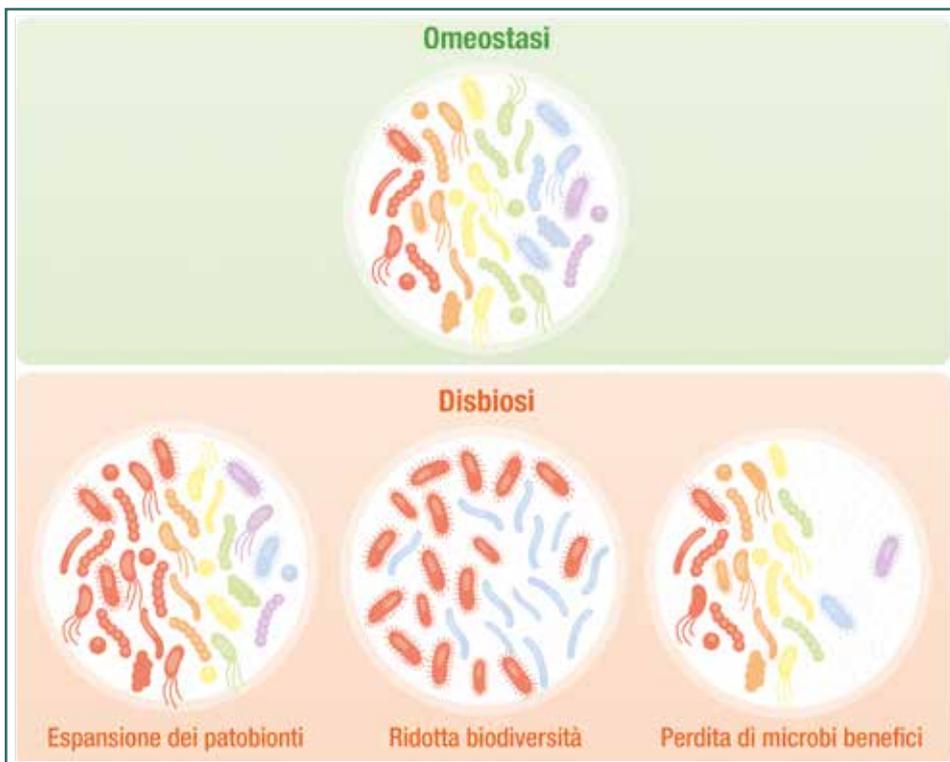


FIGURA 4

Schema che illustra le 3 possibili varianti di disbiosi, non mutuamente esclusive (da Ref. 15).

Shigella e *E. coli* - che si verifica in molti casi di enteriti infettive dopo uso di antibiotici, ma che può essere indotto anche da atti medici apparentemente “neutri”, quali la preparazione per la colonscopia (vedi oltre). Nel caso di infezioni non batteriche ma micotiche, un altro esempio è rappresentato dalla espansione del lievito *Candida* a livello vaginale o intestinale, che si può verificare dopo l’assunzione di antibiotici.

Il terzo meccanismo, la riduzione della biodiversità, si osserva in soggetti con diabete mellito di tipo 2, negli obesi e soprattutto nei soggetti anziani (Fig. 5). Nella disbiosi associata a senescenza intervengono molteplici fattori, immunologici, genetici ed ambientali, ad esempio la contrazione della varietà di alimenti contenenti prebiotici (in particolare verdura e frutta).

Nel soggetto anziano tendono a ridursi i batteri che producono SCFA - in particolare il butirrato - e quelli dotati di attività anti-infiammatoria, quali il *Faecalibacterium prausnitzii*; sembra tuttavia esistere una forte differenza tra anziano sano, il cui microbiota è sostanzialmente analogo a quello dell’adulto sano, ed

anziano fragile e/o con polipatologie che vive in strutture residenziali dedicate; in questo caso, con la contrazione drastica della biodiversità e la riduzione della produzione di metaboliti vantaggiosi quali gli SCFA, si osserva un parallelo deterioramento di parametri quali il grado di autonomia, lo stato nutrizionale, l’accentuazione dello stato infiammatorio e la presenza di depressione.

Nel complesso, tali variazioni quali-quantitative sono interpretate oggi come un fenomeno di deterioramento del MI legato all’immunosenescenza; tale processo conduce ad un MI potenzialmente meno biodiverso e quindi disbiotico, con elevato potenziale pro-infiammatorio (cd “inflammaging”) meno adatto al metabolismo saccarolitico e più a quello proteolitico.

La funzionalità del MI viene modificata dalla disbiosi a seguito di brusche variazioni alimentari, come il passaggio da una dieta povera di grassi animali ad una ricca, o viceversa, da una dieta povera ad una ricca di fibre. Il MI reagisce rapidamente a tali cambiamenti, modificando l’abbondanza relativa di

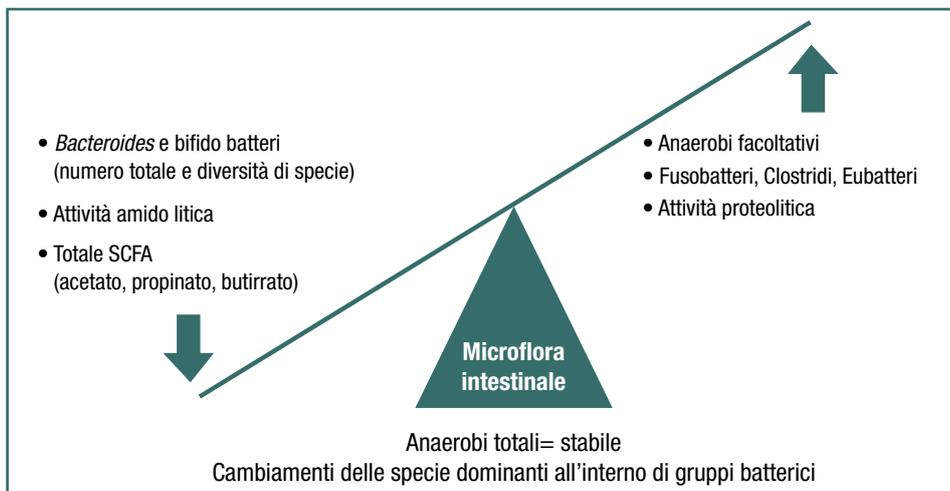


FIGURA 5

Schema delle modificazioni principali del MI nel soggetto anziano normale. Si riduce la biodiversità, in particolare l'abbondanza relativa dei batteri saccarolitici (amilolitici) e quindi la produzione di SCFA, mentre aumenta la flora anaerobia facoltativa e l'attività metabolica di tipo proteolitico (da Ref. 16).

phylum o di generi, consentendo all'organismo un veloce adeguamento metabolico alle nuove condizioni nutrizionali (10) (Fig. 6).

Una peculiare forma di disbiosi è quella legata alla terapia antibiotica, che può raggiungere un livello rilevante nell'infezione da *Clostridium difficile*; esistono infine, vari stati disbiotici determinati dall'infiammazione endoluminale (11). In ogni caso, una volta instaurata la disbiosi induce un circolo vizioso che favorisce il suo peggioramento attraverso una modificazione della permeabilità intestinale (cosiddetta "leaky gut") e l'instaurarsi di una flogosi intestinale. Quali alterazioni si accompagnano a disbiosi intestinale? Considerando le molteplici funzioni metaboliche, immunologiche e di barriera del MI, nonché le ulteriori funzioni regolatrici di tipo endocrinologico, anti-infiammatorio ed energetico, la risposta è molto complessa.

Una lista, peraltro incompleta, di stati morbosi associati a disbiosi è la seguente:

- Disturbi associati alla nutrizione (diabete di tipo 2, obesità, sindrome metabolica).
- Alterazioni infiammatorie croniche intestinali (colite ulcerosa, M. di Crohn).
- Disturbi funzionali (in particolare IBS).
- Complicanze sistemiche dell'epatopatia cronica scompensata.
- Alterazioni cardiovascolari croniche.
- Atopia/allergia.
- Cancro colo-rettale.
- Disturbi neuro-psichiatrici cronici (autismo, depressione).
- Artrite.

È verosimile peraltro che esista uno spettro di condizioni che vanno dalla perfetta salute alla malattia:

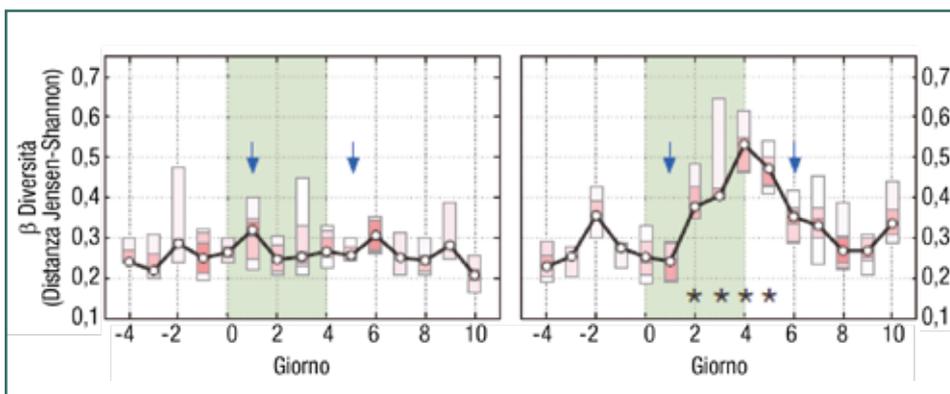


FIGURA 6

Variazione intra-individuale (β -diversità) indotta da una dieta vegetale (a sinistra) o animale (a destra), in 10 volontari sani. Le modificazioni indotte dalla dieta appaiono già un giorno dopo la variazione della dieta (da Ref. 10).

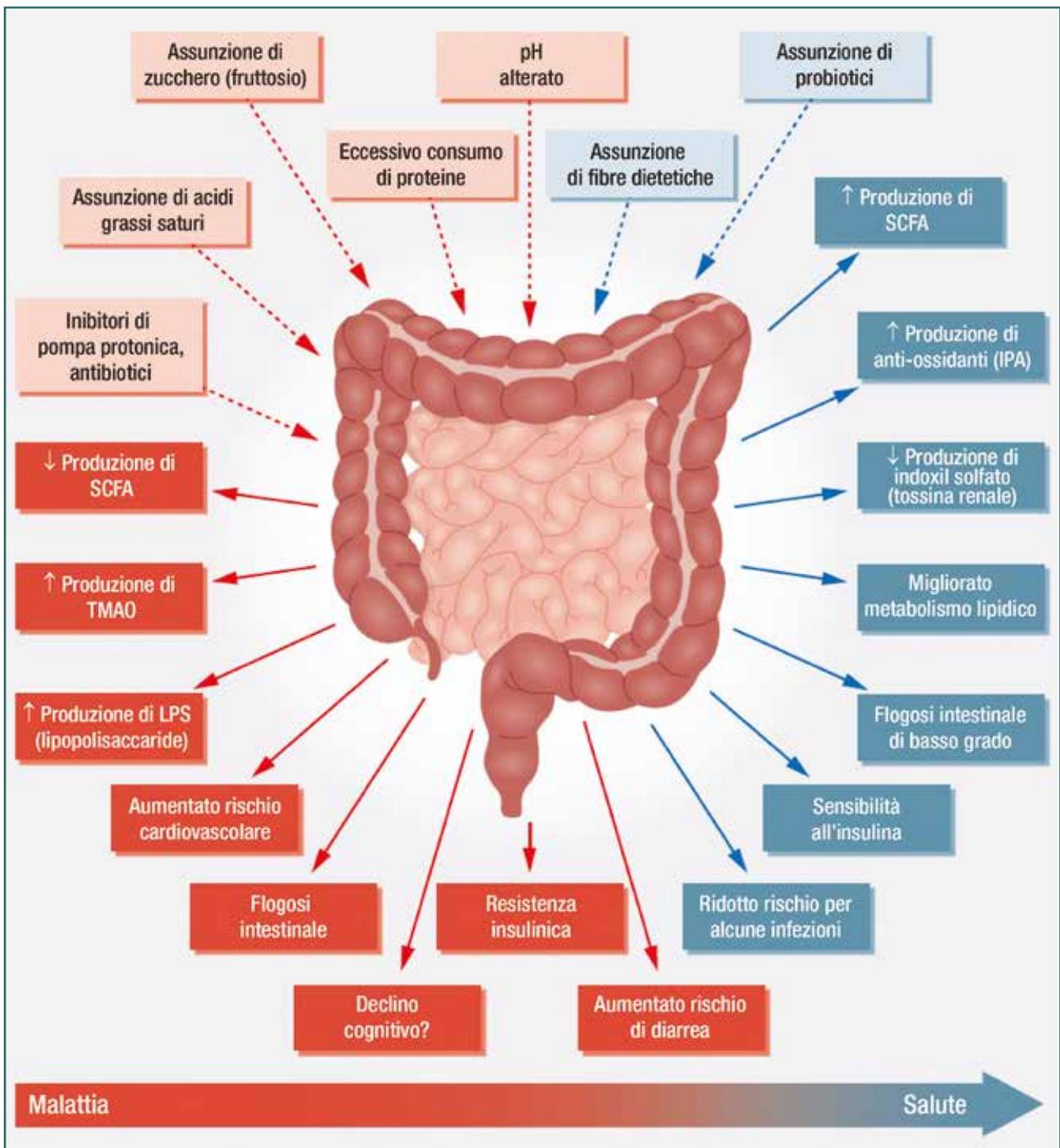


FIGURA 7

Rappresentazione schematica del ruolo del microbiota intestinale in salute e in malattia. Sono presentati alcuni esempi, riferibili alle malattie cardiovascolari.

IPA= acido indole propionico; LPS= lipopolisaccaride; SCFA= acidi grassi a catena corta; TMAO= trimetilamina N-ossido (da Ref. 17).

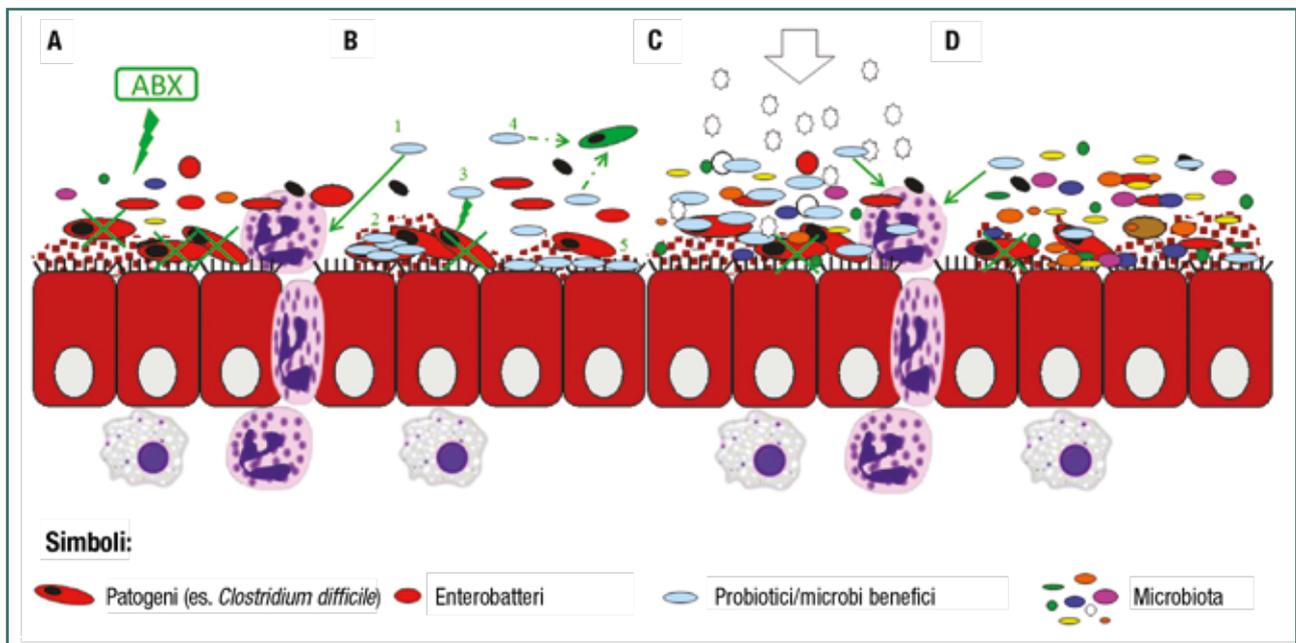


FIGURA 8

Meccanismi che possono riportare all'omeostasi intestinale da uno stato di disbiosi: A) Antibiotici specifici a spettro ristretto possono uccidere/inibire microbi patogeni senza influenzare il MI benefico; B) i probiotici possono agire con molteplici meccanismi d'azione, riassunti nella figura 9; C) interventi dietetici/somministrazione di prebiotici (si prefiggono di incrementare il numero di batteri benefici, che a loro volta si comportano da probiotici); D) il trapianto fecale determina una espansione della biodiversità, comportando un ritorno ad una situazione di omeostasi (da Ref. 18).

tale concetto di transizione graduale è esemplificato dalla figura 7.

Ripristino dell'eubiosi

Le strategie per ripristinare l'omeostasi del MI dopo che si è instaurata una disbiosi sono potenzialmente multiple e vanno dalla modificazione della dieta (eventualmente con assunzione di prebiotici), all'uso di antibiotici, al trapianto fecale, all'uso di probiotici. Ognuna di queste modalità si realizza attraverso meccanismi diversi, sinteticamente rappresentati nella figura 8.

Qui di seguito esaminiamo in dettaglio le 4 opzioni:

- a) dieta;
- b) uso di antibiotici;
- c) trapianto fecale;
- d) uso di microrganismi probiotici (eventualmente associati a fibre prebiotiche).

a) La dieta come modulatore del microbiota intestinale

Uno dei maggiori progressi nella comprensione delle funzioni del MI è il riconoscimento delle sue proprietà di "organo" metabolicamente adattabile.

Tra i numerosi fattori che modulano la composizione microbica dell'intestino, la dieta è forse il più influente. Di recente, è stato dimostrato che il MI subisce una rapida variazione composizionale a seguito di cambiamenti nella dieta, per esempio se si passa da una dieta basata su alimenti animali ad una dieta vegetariana (Fig. 6) (10). Tali variazioni risultano maggiori delle differenze interpersonali nella composizione del MI, ad indicare il forte potenziale modulante della dieta.

Le variazioni composizionali si traducono peraltro in una modificazione funzionale del microbiota, in particolare per quanto attiene al metabolismo degli aminoacidi o dei polisaccaridi. Queste osservazioni

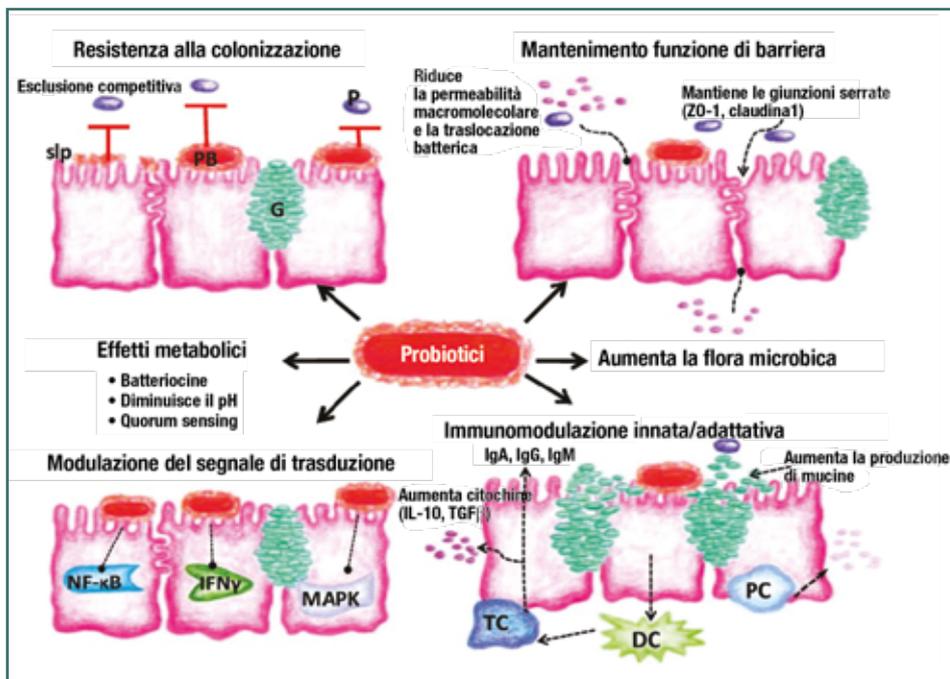


FIGURA 9
Meccanismi d'azione dei probiotici (da Ref. 19).

sottolineano il potenziale dell'intervento dietetico nel migliorare la salute umana attraverso la modulazione del microbiota intestinale.

I benefici per la salute di frutta e verdura e le proprietà anticancro di un certo numero di piante sono ampiamente noti. Tuttavia, i soggetti umani mostrano una grande variabilità nella capacità di metabolizzare substrati specifici o i loro metaboliti secondari, il che suggerisce che i benefici per la salute derivati da questi nutrienti in futuro dovranno essere personalizzati in funzione della composizione del MI.

b) Uso di antibiotici

Paradossalmente, gli antibiotici sono contemporaneamente fonte di disbiosi intestinale e presidio terapeutico in caso di disbiosi, anche nelle forme legate all'infezione da *C. difficile*. Mentre la terapia con metronidazolo è il trattamento di scelta per la malattia lieve-moderata, non è adeguata per i pazienti con malattia grave o complicata, in cui si sono dimostrati più utili trattamenti con antibiotici specifici (es. Fidaxomicina) o il trapianto fecale (vedi oltre).

c) Trapianto fecale

Recentemente, per i pazienti con infezione da *C. dif-*

ficile severa e refrattaria, in un trial controllato è stata documentata la maggiore efficacia del trapianto di microbiota fecale (FMT) rispetto al trattamento tradizionale (12); dopo quest'ultimo sono stati pubblicati ulteriori trial controllati che esaminati in una meta-analisi (13) hanno confermato la validità del FMT, indicando complessivamente una percentuale di recidiva di CDI nel gruppo trattato con FMT dell'11%, significativamente inferiore al 24,6% osservata nel gruppo di controllo.

d) Uso di microrganismi probiotici

I microrganismi probiotici, prevalentemente appartenenti alle famiglie dei *Lattobacilli* e dei *Bifidobatteri*, quando somministrati in quantità adeguate ed in grado di raggiungere vivi l'intestino, conferiscono un beneficio per la salute dell'ospite.

I microrganismi probiotici agiscono attraverso diversi meccanismi che influenzano il microbiota. Tale effetto può essere documentato attraverso le modificazioni riscontrate nella composizione batterica (ad esempio fecale) o nella attività metabolica batterica. Uno schema dei potenziali meccanismi d'azione dei microrganismi probiotici è illustrato nella figura 9.

Conclusioni

In conclusione, oggi sappiamo che il Microbiota Intestinale rappresenta un importante organo metabolicamente e immunologicamente attivo, la cui alterazione può essere un co-fattore di grande importanza in numerose malattie croniche non trasmissibili. La possibilità di manipolare terapeuticamente il MI rappresenta quindi una strada di grande interesse per la cura e la prevenzione di moltissime malattie. Attualmente, al fine di mantenere o di ripristinare l'equilibrio fisiologico della popolazione batterica intestinale, disponiamo di varie opzioni: diete, integratori alimentari contenenti una o più specie di microorganismi probiotici, preparati contenenti solo fibre prebiotiche e prodotti simbiotici, costituiti da un mix tra probiotici e prebiotici, la cui azione sulla salute è sinergica e per questo definita simbiotica.

I simbiotici hanno capacità di migliorare da un lato la sopravvivenza degli organismi probiotici e dall'altro di favorire la formazione di un substrato specifico alla flora batterica intestinale già residente. La potenzialità riconosciuta ai simbiotici di ripristinare l'equilibrio della flora intestinale benefica, può risultare utile per mantenere lo stato di salute negli individui sani.

Bibliografia

- 1) Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med* 2016;375:2369-79.
- 2) Foster KR, Schluter J, Coyte KZ, Rakoff-Nahoum S. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature* 2017;548:43-50.
- 3) The Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486(7402):207-214.
- 4) Gorkiewicz G, Moschen A. Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease. *Virchows Archiv* 2018; 472:159-172.
- 5) Costello EK et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009;326:1694-1697.
- 6) Smith PM et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013;341:569-5735.
- 7) Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ et al. Interactions between the Microbiota and the Immune System. *Science* 2012;336:1268-1273.
- 8) Tiffany CR, Bäumlér AJ. Dysbiosis: from fiction to function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2019;317: G602-G608.
- 9) Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol* 2014;16:1024-1033.
- 10) David LA, Maurice CF, Carmody RN et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505:559-563.
- 11) van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013;368:407-415.
- 12) Hui W, Li T, Liu W et al. Fecal microbiota transplantation for treatment of recurrent *C. difficile* infection: An updated randomized controlled trial meta-analysis. *PLoS ONE* 2019;14:e0210016.
- 13) Gorkiewicz G, Moschen A. Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease. *Virchows Archiv* 2018; 472:159-172.
- 14) Chassard CC, Lacroix C. Carbohydrates and the human gut microbiota. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013;16:453-460.
- 15) Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol* 2014;16:1024-1033.
- 16) Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microb* 2007;102:1178-1186.
- 17) Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of microbiota in health and disease. *BMJ* 2018;13:361-k2179.
- 18) Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological Research* 2013;69: 75-86.
- 19) Sherman PM, Ossa JC, Johnson-Henry K. Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutr Clin Pract* 2009;24:10-14.

PRODEFEN[®]

Integratore alimentare
con 7 ceppi Probiotici

Plus

**Simbiotico multispecie utile all'equilibrio
della microflora batterica intestinale¹**

POSOLOGIA

1 bustina/die per adulti
e bambini di ogni età¹

MODO D'USO

Assumere durante o dopo
i pasti. Dissolvere il contenuto
della bustina in acqua o altro
liquido come succhi di frutta o
latte a temperatura ambiente¹

Confezione da 10 bustine



Assumere ad almeno
2 ore di distanza
dall'antibiotico¹



Non contiene
glutine¹



Non influisce sulle
persone intolleranti
al lattosio¹



Non necessita
di refrigerazione¹

1. Prodefen Plus. Foglio Illustrativo.