

Microbioma intestinale e diabete mellito

Elena Ceccarelli, Aurora Patti, Laura Nigi, Guido Sebastiani, Francesca Mancarella, Francesco Dotta
U.O.C. Diabetologia, Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze, Università di Siena; Fondazione Umberto Di Mario
ONLUS - Toscana Life Science Park, Siena

L'intestino dell'uomo ospita una notevolissima quantità di microrganismi, nel loro complesso definiti come flora batterica o microbioma intestinale (1). Tale flora rappresenta, insieme al sistema immune mucosale, un'entità morfo-funzionale in delicato equilibrio, responsabile non solo dell'integrità dell'apparato gastroenterico ma, più in generale, anche della salute dell'individuo *in toto*. La microflora intestinale svolge infatti una serie di effetti benefici come quelli di barriera verso insulti esterni, di sviluppo dell'immunità innata e acquisita, oltre a numerose funzioni trofiche e metaboliche. Si viene pertanto a creare una vera e propria relazione simbiotica tra microflora intestinale e ospite, con mutui vantaggi per entrambi. Infatti, mentre il microbioma trae beneficio dall'ambiente ricco di nutrienti (quale la mucosa intestinale) per la conservazione del proprio ecosistema, l'organismo ospite trae vantaggio sia nel processo digestivo, per opera degli enzimi microbici, sia in quello di estrazione delle sostanze nutritive dagli alimenti. Tuttavia, particolari condizioni, quali variazioni nella dieta (es. maggiore apporto di grassi e carboidrati) oppure terapie antibiotiche che alterano la composizione

della flora batterica residente (disbiosi), possono dare origine a quadri patologici, come ad esempio le malattie infiammatorie intestinali (2).

Il microbioma intestinale

Questa enorme varietà di specie microbiche residenti nel lume intestinale configura un vero e proprio organo nell'organo, tanto da portare più recentemente alla definizione di "microbioma" intestinale.

Il microbioma intestinale umano è composto da oltre 100 trilioni di batteri, distribuiti in più di 1000 specie (3); il 90% dell'intero microbioma è costituito principalmente da *Firmicutes* e *Bacteroides*. Ogni individuo ha un distinto e particolare microbioma, necessario per un corretto funzionamento dell'intero intestino.

Il processo di colonizzazione microbica della mucosa intestinale ha inizio al momento della nascita, tramite il contatto con il microbioma della mucosa vaginale materna (per i neonati da parto naturale) oppure mediante il contatto con le mani degli operatori sanitari per i neonati da parto cesareo (4). Subito dopo la nascita il microbioma intestinale inizia a subire delle modificazioni, fino al raggiungimento, al termine del primo anno di vita, di una flora microbica relativamente simile a quella dell'età adulta. Parallelamente si verifica anche la rapida maturazione del sistema immunitario. Un contributo importante alla composizione del microbioma intestinale è dato dall'allattamento al seno che permette il trasferimento dalla madre al neonato non solo di nutrienti e proteine antimicrobiche che influenzano la composizione della flora microbica, ma anche di immunoglobuline di classe A (IgA, la cui specificità è determinata dal microbioma materno). Tali immunoglobuline svolgono nei primi mesi di vita un ruolo sia protettivo nei confronti di microrganismi potenzialmente patogeni, sia immunomodulante nel processo di sviluppo del sistema immunitario del bambino. Oltre

FAD ECM "il Diabete"

Questa rassegna fa parte di un percorso di **formazione a distanza** accreditato a livello nazionale e disponibile gratuitamente nell'aula virtuale della SID (<http://sidfad.accmed.org>).

Per partecipare al corso occorre:

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

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

Per ulteriori informazioni: <http://sidfad.accmed.org>

all'allattamento al seno, altri fattori contribuiscono alla corretta composizione del microbioma intestinale; tra questi il progressivo sviluppo del sistema immunitario, l'aumento delle dimensioni del corpo e quindi dell'intestino, le malattie intercorrenti, il tipo di alimentazione e l'eventuale assunzione di terapie antibiotiche. Durante l'adolescenza e nell'età adulta variazioni dello stile di vita (attività sessuale, droghe, fumo, attività fisica, abitudini alimentari, viaggi) influenzano profondamente la composizione del microbioma intestinale. Nell'età avanzata, infine, hanno inizio i processi d'invecchiamento e in questa fase della vita è più probabile andare incontro a malattie ed essere quindi sottoposti a terapie farmacologiche (2, 4) che possono a loro volta alterare il microbioma.

Il microbioma intestinale è caratterizzato da un'elevata variabilità sia interindividuale sia intraindividuale (es. la mucosa dell'ileo distale e del colon costituisce il sito di maggiore colonizzazione microbica e rappresentazione delle diverse specie, soprattutto batteriche) e si ritiene che alla base della composizione del microbioma possano contribuire fattori sia genetici sia ambientali (3-5). A tal proposito è stato visto come topi geneticamente identici, facenti parte della stessa nidiata, presentino maggiori analogie nella composizione del microbioma rispetto a topi provenienti da nidiate diverse; tuttavia, i topi appartenenti alla stessa famiglia che vengono allevati in ambienti separati sviluppano delle differenze nella popolazione microbica intestinale, verosimilmente a causa dell'influenza di fattori ambientali (4, 6). Inoltre, dati sull'uomo mostrano come i membri di una stessa famiglia abbiano maggiori similitudini nella popolazione microbica rispetto a coloro che non hanno vincoli di parentela, presentando gli stessi ceppi batterici (4).

Numerosi studi dimostrano che la dieta svolge un ruolo fondamentale nella composizione del microbioma intestinale in quanto le differenti specie microbiche risulterebbero specifiche per i vari substrati alimentari (4). Oltre alla dieta, anche l'esercizio fisico sembra in grado di influenzare la diversità del microbioma nel ratto, mentre nell'uomo la perdita di peso legata all'aumento dell'attività fisica sembra essere dipendente dalla composizione della flora batterica intestinale (4). Più difficile da stabilire è il contributo dei fattori genetici alla composizione del microbioma. Un tentativo di analisi del microbioma intestinale in differenti aree geografiche e tra gemelli mono- e di-zigoti è stato condotto da Yatsunenko che ha documentato un ruolo

importante dello stile di vita e delle condizioni ambientali nella composizione del microbioma intestinale (7). Molti dei geni che intervengono nella composizione del microbioma intestinale codificano per componenti del sistema immunitario, altri per molecole coinvolte in processi metabolici. Come esempio può essere citato il TLR5, molecola espressa sulla superficie basolaterale delle cellule dell'epitelio intestinale e che riconosce la flagellina, una proteina facente parte del flagello batterico. Uno studio ha dimostrato come un'ampia percentuale di topi *knock-out* per il gene TLR5 abbia un'alterata composizione della flora microbica intestinale e sviluppi la sindrome metabolica (8).

Microbioma intestinale e sistema immunitario

Il delicato equilibrio tra microbioma intestinale e organismo ospite si è evoluto in milioni di anni di convivenza per mantenere una dinamica e pacifica interazione tra entrambe le parti. Le strategie adottate dall'organismo per difendersi dall'invasione e dal danno di agenti patogeni sono rappresentate dalla presenza di un sottile strato di muco che limita il contatto diretto tra microbioma e cellule epiteliali (9), dalla produzione di fattori antimicrobici che riducono la suscettibilità all'infiammazione (9) e dalle cellule linfoidi, il cui sviluppo e la cui funzione dipendono da specifici fattori di trascrizione quali FoxP3 e ROR (*retinoic acid-related orphan receptor*) (9). Il muco è composto da mucine altamente glicosilate che costituiscono i nutrienti per il microbioma residente, come *Bifidobacterium* e *Bacteroides*. Questi batteri fermentano le mucine, con produzione di acidi grassi a catena corta che sono tossici per alcuni patogeni (10). La superficie mucosa non è soltanto una barriera fisica ma rappresenta l'interfaccia attraverso la quale il sistema immunitario riconosce le sostanze estranee e inizia un'appropriata risposta immunitaria (10). In risposta alla presenza di germi commensali ha luogo l'attivazione del fattore MyD88, responsabile del rilascio di peptidi antimicrobici da parte delle cellule epiteliali intestinali, contribuendo così alla funzione di barriera (11). Il sistema immunitario è inoltre capace di identificare le molecole appartenenti ai microbi, definite con il termine generico di *microbe-associated molecular patterns* (MAMP), attraverso recettori specifici (*pattern recognition receptors*, PPR) espressi sulle cellule epiteliali. Sono note tre diverse famiglie di recettori in grado di

individuare le strutture MAMP: TLR (*toll-like receptors*), RLR (*retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-like receptors*) e NLR (*nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors*). Ciascuna famiglia di recettori è deputata al riconoscimento di specifiche strutture microbiche. I TLR sono i più noti e riconoscono MAMP sia extracellulari sia endocitati. I recettori RLR riconoscono invece RNA di natura virale mentre quelli di tipo NLR riconoscono ligandi batterici e tossine (12). La localizzazione di questi recettori è varia: TLR2 e TLR4 sono espressi nelle cellule epiteliali delle cripte, laddove prevalgono le cellule staminali pluripotenti; TLR3 prevale negli enterociti maturi dell'intestino tenue e del colon, mentre TLR5 è espresso soprattutto nel colon (12). Generalmente tali recettori sono collocati sia sulla membrana basolaterale sia su quella apicale; studi recenti hanno evidenziato la presenza di TLR4 sulla membrana dell'apparato del Golgi, dove sembra svolgere un ruolo nell'attivazione di NF- κ B (*nuclear factor- κ -light-chain-enhancer of activated B cells*). In seguito al legame con il proprio ligando i recettori TLR reclutano proteine adattatrici e chinasi cellulari, con attivazione delle vie molecolari di MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e NF- κ B (12), seguita dalla traslocazione di NF- κ B all'interno del nucleo laddove tale fattore è responsabile dell'espressione di citochine e chemochine proinfiammatorie. TLR3 e TLR4 possono anche condurre all'attivazione del sistema degli interferoni (12). I batteri patogeni sono virulenti e possono invadere le cellule epiteliali, con traslocazione delle loro componenti (i MAMP) all'interno del citosol dove sono strategicamente localizzati i NLR. Le specie batteriche residenti, invece, sono meno virulente e tendono a rimanere sulla superficie apicale dove sono presenti i TLR. L'attivazione dei recettori apicali TLR9 innesca meccanismi diversi dall'attivazione degli stessi recettori posti sulla membrana basolaterale. L'attivazione apicale avvia meccanismi di tolleranza, mentre quella basolaterale attiva la via classica di NF- κ B (12). La distribuzione dei recettori è pertanto un fattore importante nella regolazione della loro funzione di difesa. La risposta immunitaria di tipo adattativo fornisce un'ulteriore protezione nei confronti della penetrazione degli agenti patogeni attraverso la produzione di IgA. Le IgA secretorie riconoscono e opsonizzano i batteri all'interno del lume intestinale. Le IgA vengono prodotte dai linfociti B sia con modalità T-dipendente sia indipendentemente dalla stimolazione da parte dei linfociti T. Nel primo caso le cellule B seguono la via classica di attivazione all'interno dei centri germinativi in

risposta alla stimolazione delle cellule dendritiche che hanno riconosciuto l'agente microbico. L'attivazione T-indipendente è invece mediata da citochine infiammatorie (come il fattore attivante le cellule B - BAFF e il ligando inducente la proliferazione - APRIL) (13) rilasciate dalle cellule intestinali che sono venute in contatto con sostanze microbiche, stimolando direttamente la proliferazione delle cellule B (10).

I batteri commensali hanno sviluppato alcune strategie per convivere all'interno dell'intestino dell'organismo ospite, riducendo l'attivazione della risposta immunitaria nei propri confronti. La colonizzazione di topi con *Bacteroides fragilis* comporta la produzione di linfociti T secernenti interleuchina (IL)-10 con funzioni regolatorie e soppressione della risposta pro-infiammatoria (14). Infatti, *Bacteroides* e *Lactobacillus* inibiscono ad esempio la via NF- κ B che è fondamentale nell'induzione dell'espressione di geni pro-infiammatori.

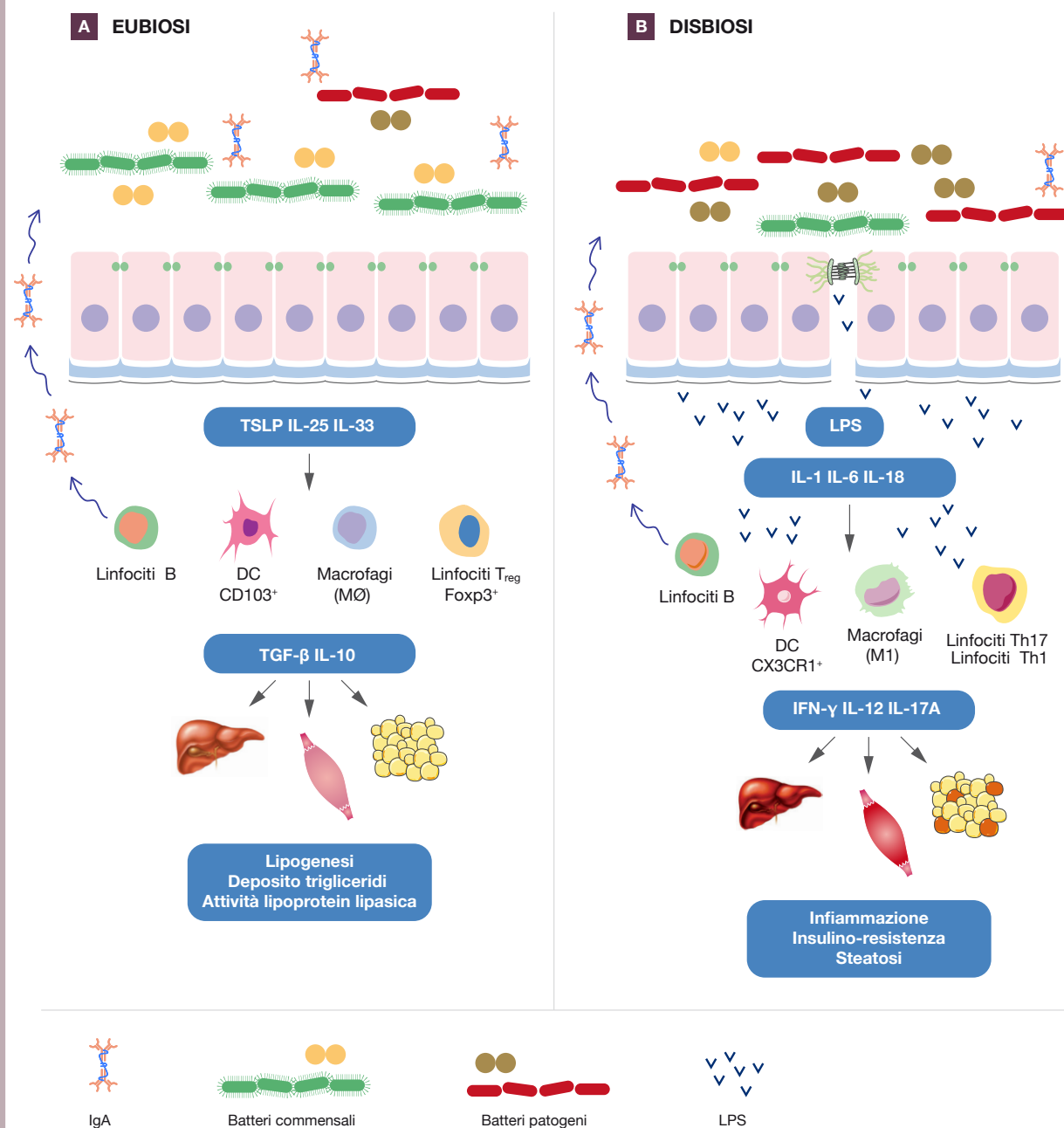
In condizioni di equilibrio (eubiosi - **Figura 1A**) le cellule intestinali secernono la lipoproteina timica stromale (TSLP) e le interleuchine IL-33 e IL-25 che, a loro volta, promuovono l'attivazione di un sottogruppo di cellule dendritiche con proprietà tollerogeniche, identificabili mediante l'espressione dell'integrina α E β 7 (CD103) (15). Le cellule intestinali producono inoltre *transforming growth factor* (TGF)- β , responsabile da un lato della soppressione del segnale mediato da NF- κ B e dall'altro della promozione delle cellule T-regolatorie (T_{reg}) e delle plasmacellule secernenti IgA.

Le cellule dendritiche sono un tipo di cellule presentanti l'antigene altamente specializzato e sono responsabili del differenziamento delle cellule T naïve e della produzione di IgA indotta dalle cellule T mature. Gli antigeni presentati dalle cellule CD103⁺ favoriscono lo sviluppo di T_{reg} e di IgA che raggiungono la lamina propria, con conseguente riduzione della risposta infiammatoria (16). Il sottogruppo di cellule CD103⁺ sembra essere correlato alla regolazione della tolleranza attraverso l'attivazione di cellule T FoxP3⁺ (12).

Nel controllo del microbioma intestinale sono coinvolti diversi sottotipi di linfociti T, tra cui le T_{reg} CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, le T_{reg} di tipo 1 CD4⁺FoxP3⁻ (Tr1) e le cellule Th17. In generale, le cellule Th17 promuovono la risposta immune di tipo infiammatorio, mentre le T_{reg} sopprimono la risposta eccessiva o l'attivazione immune non idonea e hanno pertanto un ruolo anti-infiammatorio (10).

L'induzione delle T_{reg} mostra una notevole plasticità che influenza la risposta adattativa nei confronti del

Figura 1 Interazioni tra microbioma intestinale e sistema immunitario in condizioni di eubiosi e di disbiosi



A. In caso di eubiosi, le cellule epiteliali rilasciano fattori antimicrobici e citochine anti-infiammatorie che riducono le interazioni con i batteri presenti. Il contatto con le strutture microbiche (MAMP) stimola lo sviluppo di macrofagi e cellule dendritiche con proprietà tollerogeniche. Un sottotipo di cellule dendritiche CD103⁺ riconosce gli antigeni microbici e induce sia l'attivazione di linfociti T-regolatori sia la produzione di IgA, contribuendo alla difesa contro l'invasione da parte di agenti patogeni. La presenza di germi commensali regola il metabolismo energetico, fornendo substrati lipogenici (acidi grassi a catena corta, monosaccaridi) al fegato e aumentando l'attività enzimatica della lipoprotein lipasi (LPL), con rilascio di acidi grassi dalle lipoproteine circolanti al tessuto adiposo e muscolare. **B.** In caso di disbiosi la penetrazione degli antigeni batterici e in particolare del lipopolisaccaride (LPS) induce l'attivazione di sistemi di difesa proinfiammatori, con rilascio di citochine infiammatorie da parte delle cellule epiteliali. Le cellule dendritiche CX3CR1⁺, i macrofagi e i linfociti T attivati rilasciano citochine infiammatorie che promuovono da un lato l'endotossemia e dall'altro l'induzione di uno stato infiammatorio che innesca a sua volta lo sviluppo di disordini metabolici come l'insulino-resistenza, la steatosi e l'infiltrazione macrofagica del tessuto adiposo.

microbioma. Quando attivate dalle citochine proinfiammatorie le cellule T possono andare incontro a variazioni nell'espressione dei fattori di trascrizione e possono essere convertite in cellule T produttrici IL-17 e interferone (IFN)- γ (17).

Il sistema immunitario dell'ospite, attraverso un'iniziale piccola comunità preformata di microbi e al successivo incontro con nuove specie microbiche, viene educato nel tempo a riconoscere tali strutture e a integrarsi con esse. Modificazioni nel corredo genico dell'ospite o vari fattori scatenanti, come l'alterazione della composizione della flora intestinale (disbiosi), potrebbero modificare il fine equilibrio tra microbioma e ospite, contribuendo così allo sviluppo e/o alla progressione di quadri patologici.

Microbioma intestinale e metabolismo energetico

Numerosi studi hanno confermato che il microbioma intestinale è anche coinvolto nella regolazione dell'omeostasi energetica (18). Backhed et al., attraverso lo studio di topi fatti crescere in totale assenza di germi (*germ-free*), hanno fornito evidenze circa il ruolo cruciale del microbioma intestinale nel processo di estrazione di energia dai nutrienti e nel suo utilizzo nell'organismo (19). Questi topi mostrano una riduzione del 40% della massa grassa rispetto a topi di controllo sottoposti a una dieta con un contenuto calorico medio del 29% inferiore rispetto a quelli *germ-free*. Inoltre, studiando topi convenzionalizzati, cioè topi che vengono colonizzati alla nascita con flora batterica prelevata dal colon di un topo normale, è stato evidenziato che in questi ultimi il processo di "convenzionalizzazione" determinava un aumento del 60% del grasso corporeo e dell'insulino-resistenza in sole due settimane, nonostante una diminuzione dell'introito calorico. Questo aumento potrebbe essere spiegato da un incremento dell'assorbimento intestinale di glucosio, dell'estrazione di energia da componenti non digeribili dei nutrienti e da un concomitante aumento dei livelli di insulinemia e di glicemia che sono punti fondamentali nella regolazione della lipogenesi. Inoltre, sia l'insulina sia la glicemia promuovono la neosintesi epatica di acidi grassi attraverso l'incremento dell'espressione di acetil coenzima A carbossilasi (ACC) e dell'acido grasso sintetasi (FAS), controllati a loro volta da *carbohydrate responsive element binding protein* (ChREBP) e *sterol responsive element binding protein* (SRBEP)-1 (20).

Nei topi convenzionalizzati è stato riscontrato un aumento dei livelli di mRNA sia di ChREBP sia di SRBEP-1, con un possibile incremento dei livelli di polisaccaridi che giungono al fegato e che rappresentano nuovi substrati per la lipogenesi. Infatti, i carboidrati complessi vengono degradati a oligosaccaridi e monosaccaridi e poi fermentati ad acidi grassi a catena corta (SCFAS), principalmente acetato, propionato e butirrato, che costituiscono substrati per la gluconeogenesi e per la lipogenesi epatica (21). Gli stessi autori hanno inoltre dimostrato che la convenzionalizzazione determina inoltre un aumento nell'attività della lipoprotein lipasi (LPL).

Pertanto, oltre ad avere un'importanza nella regolazione dell'omeostasi energetica, le alterazioni del microbioma intestinale sono state associate anche all'obesità. Ley et al. hanno infatti documentato che nei topi ob/ob sono presenti una riduzione del 50% della popolazione dei *Bacteroides* e un aumento proporzionale di *Firmicutes* (6).

Anche nell'uomo è stato confrontato il microbioma dell'intestino distale di soggetti obesi con quello di individui normopeso. Prima dell'intervento dietetico gli uomini obesi avevano una percentuale più bassa di *Bacteroides* e maggiore di *Firmicutes* rispetto ai soggetti magri. Dopo 52 settimane di dieta il rapporto tra *Bacteroides* e *Firmicutes* si avvicinava molto di più a quello dei soggetti magri (5). Inoltre, i livelli di *Bacteroidetes* aumentavano quando si riduceva il peso corporeo con un regime calorico povero di grassi e/o di carboidrati, suggerendo che tali batteri possono essere reattivi all'introito calorico (5).

Il microbioma intestinale sembra essere in grado di incrementare il contenuto energetico che deriva dalla dieta. Infatti, Ley et al. (22) hanno mostrato che trapiantando il microbioma cecale da topi magri o da topi ob/ob in riceventi *germ-free* dopo due settimane gli animali che avevano ricevuto il microbioma dal ceppo ob/ob presentavano un aumento del tessuto grasso e una maggiore capacità di estrarre calorie dai cibi che ingerivano, rispetto ai topi che avevano ricevuto il microbioma da donatori magri. Tuttavia, a fronte della dimostrazione che il microbioma intestinale può avere un ruolo cruciale nello sviluppo dell'adiposità e nella regolazione dell'omeostasi, rimane ancora da provare come tale microbioma possa essere coinvolto nello sviluppo dell'infiammazione di basso grado che è classicamente associata alla sindrome metabolica e all'obesità (18). È stato infatti documentato che l'obesità si associa a uno

stato d'infiammazione sistemica cronica di basso grado. Il primo legame molecolare tra infiammazione e obesità è stato identificato nel *tumor necrosis factor* (TNF)- α , una citochina proinfiammatoria iperespressa nel tessuto adiposo e nel muscolo di individui obesi. Il TNF- α causa insulino-resistenza attraverso la fosforilazione della serina su una molecola, IRS-1, coinvolta nella trasmissione del segnale insulinico, che viene così inattivata (18). La conseguente condizione di insulino-resistenza determina a sua volta, come noto, iperinsulinemia e quindi una tendenza alla deposizione di lipidi nei tessuti epatico e adiposo. Altre molecole proinfiammatorie, come IL-1, IL-6 e MCP-1, sarebbero implicate nel processo infiammatorio alla base non solo dell'insulino-resistenza, ma anche dello sviluppo del diabete tipo 2 (DMT2).

È stata ipotizzata l'esistenza di un fattore di origine microbica, ovvero il lipopolisaccaride batterico (LPS), capace di fungere da fattore scatenante, al pari degli acidi grassi, del suddetto stato infiammatorio cronico di basso grado. Si tratta di una molecola continuamente prodotta all'interno dell'intestino umano (Figura 1B), derivante dalla morte di batteri Gram-negativi, che subisce una fisiologica traslocazione dal lume intestinale ai capillari intestinali attraverso un meccanismo TLR4-dipendente (23). L'LPS stimola il processo infiammatorio legandosi al complesso CD14 e al TLR4 sulla superficie delle cellule dell'immunità innata.

È stato dimostrato che in topi sottoposti a un'alimentazione ricca di grassi per almeno due settimane si verifica un aumento notevole della concentrazione di LPS plasmatico (24); questa condizione è stata definita come "endotossemia metabolica". Per confermare questo dato sono stati studiati topi trattati cronicamente con infusione di basse dosi di LPS. Dopo 4 settimane i topi infusi mostravano un fenotipo caratterizzato da iperglicemia a digiuno, obesità, steatosi, infiltrati di macrofagi nel tessuto adiposo, insulino-resistenza epatica e iperinsulinemia (24). Questa relazione tra processo infiammatorio e LPS sembrerebbe causata dal legame di quest'ultimo con il complesso CD14/TLR4, come indicano studi eseguiti sui topi *knock-out* per CD14, che risultano essere ipersensibili all'insulina, suggerendo quindi che il CD14 possa essere un modulatore dell'insulino-sensibilità anche in condizioni fisiologiche (24).

Per analizzare il contributo reale del microbioma intestinale allo sviluppo dell'endotossemia metabolica e dell'infiammazione sono stati effettuati studi con sostanze, quali antibiotici, probiotici e prebiotici, che hanno la capacità di alterare tale microbioma. Nei topi

ob/ob trattamenti antibiotici per 4 settimane hanno modificato radicalmente la composizione del microbioma, determinando una riduzione di *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp* e di *Bacteroides-Prevotella*, con una significativa diminuzione dell'endotossemia metabolica e un conseguente miglioramento dello stato infiammatorio (25).

Numerosi studi hanno mostrato che i bifidobatteri, considerati come batteri benefici del microbioma intestinale, riducono l'endotossina intestinale e migliorano la funzione di barriera della mucosa (26); viceversa, una dieta ricca di grassi causa un'alterazione della composizione del microbioma intestinale, con diminuzione del contenuto di *Bifidobacterium spp*.

La concentrazione di bifidobatteri può essere aumentata anche dall'uso di prebiotici nella dieta, ovvero di sostanze presenti nel cibo che non vengono assorbite dall'organismo ma utilizzate dalla flora intestinale. Nei topi trattati con prebiotici si assiste infatti a un incremento della concentrazione di bifidobatteri che correla positivamente con un miglioramento della tolleranza al glucosio, con la secrezione di insulina glucosio-indotta e che determina un miglioramento dell'endotossemia e una riduzione delle citochine proinfiammatorie (27).

Studi eseguiti negli ultimi anni sull'uomo hanno evidenziato la presenza di endotossemia in individui con un regime alimentare ricco di grassi; tale endotossemia è in grado di indurre il rilascio nel tessuto adiposo di numerose citochine proinfiammatorie come TNF- α e IL-6 e di peggiorare l'insulino-resistenza in soggetti sani (28). Anche nei pazienti con *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) e *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) sono stati riscontrati aumentati livelli di LPS, con conseguente attivazione della via proinfiammatoria NF- κ B e con incremento dell'espressione epatica dei geni regolatori dell'espressione di TNF- α (29).

Creely et al. hanno dimostrato che nell'uomo l'endotossemia potrebbe agire come un fattore coinvolto nello sviluppo del DMT2 e dell'obesità (30). Gli autori hanno infatti osservato che i livelli di endotossemia sono doppi nei pazienti diabetici tipo 2 rispetto ai soggetti di controllo.

Oltre al loro effetto sulla endotossemia metabolica, i prebiotici possono anche modulare altri target che influenzano disordini metabolici come l'obesità; per esempio, possono condizionare la produzione di ormoni intestinali, tra cui *glucagon-like peptide* (GLP)-1 e *glucose-dependent insulintropic peptide* (GIP), peptide YY (PYY), ghrelina e oxintomodulina. Il legame ipote-

tico tra la fermentazione di carboidrati non digeribili da parte del microbioma intestinale e la stimolazione della sintesi e della secrezione di ormoni intestinali è stato già proposto nel 1987 da Goodlad (31). Altri studi più recenti hanno dimostrato che un'alimentazione ricca di prebiotici fibre di oligofruttosio determinava delle modifiche nella produzione di alcuni ormoni anche nel paziente con DMT2, con conseguente protezione contro l'aumento di peso e l'insulino-resistenza epatica (32).

Microbioma intestinale e diabete mellito tipo 2

Un recente studio di Qin et al. (33) ha analizzato i campioni fecali di una popolazione cinese di 345 individui (diabetici tipo 2 e controlli sani), utilizzando la metodologia del *next generation sequencing* (NGS). La caratterizzazione tassonomica del genoma esaminato non ha mostrato differenze significative tra i soggetti diabetici e quelli non diabetici. Tuttavia, nei soggetti sani vi era una prevalenza di batteri produttori di butirrato (*Clostridiales* sp. SS3/4, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* e *Roseburia inulinivorans*), mentre nei pazienti diabetici prevalevano genomi di patogeni opportunisti come *Bacteroides caccae*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium symbiosum*, *Eggerthella lenta* ed *Escherichia coli*. Questi dati pertanto non evidenziano la presenza di una specifica popolazione residente nell'intestino che correlerebbe con il DMT2, come invece è stato osservato per altre patologie. Ulteriori indagini hanno suggerito l'ipotesi di una disbiosi di tipo funzionale in cui l'alterazione - o meglio la predisposizione a sviluppare la malattia - sarebbe da individuare da un lato nell'arricchimento di fattori legati allo stress ossidativo come catalasi, glutazione reduttasi e perossiredoxina, dall'altro nella riduzione di motilità cellulare, assemblaggio delle strutture flagellari, biosintesi del butirrato e, infine, nella diminuzione del metabolismo di cofattori e vitamine. Il microambiente intestinale avrebbe pertanto un ruolo nella suscettibilità di questi pazienti a sviluppare la malattia (33).

La composizione del microbioma intestinale è stata recentemente correlata al rischio di sviluppare DMT2 anche in una popolazione di donne europee (34). Campioni di feci sono stati raccolti da 145 donne (pazienti con DMT2, con alterata tolleranza glucidica - IGT o con normale tolleranza glucidica - NGT). Tali campioni sono

stati analizzati utilizzando la metodologia NGS al fine di ottenere e classificare il DNA genomico. I risultati hanno documentato un aumento di *Lactobacillus* e una riduzione di alcune specie di *Clostridium* nelle pazienti con DMT2 rispetto al gruppo NGT. Sono state inoltre valutate le caratteristiche funzionali del microbioma esaminato, impiegando particolari algoritmi in combinazione con la rete metabolica KEGG e sono state osservate importanti differenze tra i gruppi NGT e DMT2, in accordo con lo studio sulla popolazione cinese di Qin et al. (33). Nelle pazienti con DMT2, ad esempio, è stato rilevato un aumento delle vie metaboliche della cisteina e della metionina, vie molecolari associate alla sintesi del glutatione e quindi legate alla risposta allo stress ossidativo.

La modulazione del microbioma intestinale come strategia terapeutica nel diabete autoimmune

Il diabete tipo 1 (DMT1) è una malattia autoimmune cronica che si sviluppa in individui geneticamente predisposti ed è caratterizzata dalla distruzione delle cellule β -pancreatiche da parte del sistema immunitario (35). Il topo NOD (*non-obese diabetic*) è uno dei modelli animali più utilizzati nelle ricerche sulla fisiopatologia del DMT1. Infatti, in questo ceppo murino si sviluppa una forma spontanea di diabete molto simile, per vari aspetti, al DMT1 umano, rappresentando così un modello per studiare possibili approcci terapeutici (35). La percentuale di sviluppo del diabete nel topo NOD è di circa l'80% nel sesso femminile e del 20-40% in quello maschile. In tutti gli animali è presente un processo infiammatorio a carico delle isole pancreatiche, definito insulite, che inizia a partire dalla quarta settimana di età e che colpisce l'80% degli animali a 10 settimane. Il diabete inizia a manifestarsi intorno alla 12^a settimana di età; la malattia si rende evidente clinicamente intorno alla 17^a-24^a settimana.

Recenti osservazioni fatte sull'uomo e su modelli animali hanno concentrato l'attenzione sul possibile coinvolgimento del tratto gastrointestinale nella patogenesi del diabete autoimmune (36). I fattori che possono contribuire all'autoimmunità del DMT1 possono essere una mucosa intestinale alterata, un ecosistema microbico intestinale aberrante e un'alterata responsività del sistema immunitario intestinale ad agenti patogeni (virus) o comunque immunogeni (37).

Nei modelli animali è stato inoltre visto un legame tra il tessuto linfoide associato all'intestino (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) e il diabete autoimmune. Infatti, i linfociti mesenterici isolati da topi NOD di 3 settimane di età hanno un elevato potenziale diabetogenico, mentre manipolazioni della dieta sono in grado di modificare l'incidenza della malattia e l'autoimmunità β -cellulare. Per questo motivo la modulazione di GALT può rappresentare un mezzo importante per meglio comprendere la storia naturale del diabete autoimmune.

Studi condotti in modelli animali di diabete autoimmune hanno evidenziato tre fattori che legano la patogenesi del DMT1 alla risposta immunitaria intestinale:

1. alterazioni del microbioma intestinale
2. modificazioni della permeabilità della mucosa intestinale
3. alterata responsività del sistema immunitario intestinale ad agenti patogeni (virus) o comunque immunogeni (es. sostanze alimentari) che possono indurre intolleranze.

Un interesse sempre maggiore è rivolto verso i probiotici, batteri innocui per l'ospite che possono agire come immunomodulatori naturali e che hanno mostrato proprietà anti-infiammatorie nelle allergie e nelle malattie infiammatorie croniche intestinali. Questo effetto è dovuto probabilmente alla capacità dei probiotici di aderire alla mucosa, di inibire la colonizzazione da parte di agenti patogeni, di produrre fattori che rinforzano la barriera intestinale preservandone l'integrità e di modulare le risposte immunitarie da parte dell'organismo (38).

Meccanismo di azione dei probiotici

Da tali osservazioni si può ipotizzare l'utilizzo di modulatori della flora batterica intestinale (probiotico) ai fini di una reversione del processo autoinfiammatorio/autoimmunitario che è presente nel DMT1 (37). Infatti, correggendo le alterazioni della flora sarebbe teoricamente possibile stimolare la produzione di IL-10 e TGF- β che, comportandosi da immunomodulatori, potrebbero inibire i processi flogistici che interessano le isole pancreatiche. Inoltre, i probiotici agiscono anche sulla permeabilità della mucosa, provocando una maggior produzione di proteine coinvolte nelle giunzioni occludenti tra le cellule.

I probiotici sono microorganismi che colonizzano la mucosa intestinale e interagiscono direttamente o indirettamente con il sistema immunitario, modulando l'attività delle cellule che ne fanno parte. Essi possono da una parte rafforzare la risposta contro alcuni antigeni e dall'altra indurre tolleranza nei confronti di altri. La tol-

leranza verso un commensale si ha quando un antigene "innocuo" è riconosciuto da linfociti T-regolatori che, producendo citochine anti-infiammatorie, riducono la risposta immunitaria verso quel dato antigene.

In un precedente studio collaborativo (39) abbiamo dimostrato che l'uso combinato di una miscela di probiotici, il VSL#3[®], contenente bifidobatteri (*B. longum*, *B. infantis* e *B. breve*), lactobacilli (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp.*, *L. bulgaricus* e *L. plantarum*) e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, somministrati in topi NOD al momento dello svezzamento, diminuisce significativamente la comparsa del diabete attraverso un incremento della produzione di IL-10 da parte di linfociti a livello sia delle placche del Peyer sia della milza, con conseguente aumento di T_{reg} (39). Tuttavia, tale trattamento risulta efficace se somministrato in età precoce, mentre perde la propria efficacia se utilizzato al momento della diagnosi di diabete.

Di sicuro interesse è l'osservazione (40) che il batterio probiotico *Lactococcus Lactis* (LL), ingegnerizzato a esprimere la proinsulina (pINS) e la citochina anti-infiammatoria IL-10, somministrato in combinazione con una terapia immunosoppressoria (anti-CD3) a basse dosi, rappresenta una strategia terapeutica promettente in un modello animale di diabete autoimmune. Infatti, in topi NOD ai quali è stato somministrato tale trattamento terapeutico combinato si è riscontrata la scomparsa del diabete in circa il 60% dei casi. Inoltre, è stato osservato che la somministrazione del solo LL esprimente pINS e IL-10 porta alla guarigione del 20% della popolazione, analogamente a quanto accade con la sola somministrazione dell'anticorpo anti-CD3. Tale fenomeno di regressione del diabete sembra essere principalmente dovuto all'induzione di una risposta antigene-specifica di linfociti T-regolatori, la cui presenza è risultata aumentata all'interno degli infiltrati linfocitari che comunemente circondano le isole pancreatiche. Tali linfociti T-regolatori erano inoltre caratterizzati da un incremento dell'attività soppressoria antigene-specifica (40). Studi clinici nell'uomo saranno necessari per stabilire la reale efficacia di tale trattamento in pazienti con autoimmunità β -cellulare.

Conclusioni

È ormai chiaro che l'abbondante comunità microbica residente nell'intestino ricopre un ruolo fondamentale in numerosi processi fisiologici dell'organismo ospite, quali

il rafforzamento della barriera epiteliale intestinale, lo sviluppo del sistema immunitario e l'assorbimento di nutrienti. Inoltre, un'importante funzione del microbioma intestinale consiste nel promuovere fenomeni di protezione dalla colonizzazione di batteri patogeni. È stato anche dimostrato che nei mammiferi i batteri commensali partecipano alla digestione del cibo e all'estrazione e alla sintesi di nutrienti e di altri metaboliti essenziali per il mantenimento dello stato di salute. È di sicuro interesse che molti di questi nutrienti e metaboliti sono coinvolti nello sviluppo e nell'omeostasi del sistema immunitario, suggerendo l'ipotesi che tali batteri commensali possano influenzare la risposta immunitaria dell'ospite mediante meccanismi nutrienti- e metaboliti-dipendenti.

Altrettanto interessante è la crescente mole di dati sull'importanza del microbioma intestinale come fattore ambientale responsabile dello sviluppo di numerose patologie immuno-mediate (es. malattie infiammatorie croniche intestinali, malattie autoimmuni) e metaboliche, quali l'obesità, il diabete mellito e le malattie cardiovascolari. Ad esempio, un importante studio di meta-genomica (33) ha mostrato come pazienti con DMT2 siano caratterizzati da un quadro di disbiosi nel lume intestinale, con una riduzione di batteri produttori di butirrato e un aumento di patogeni opportunisti. Nel caso del DMT1 un recente studio finlandese (41) ha evidenziato alterazioni nella flora batterica intestinale di soggetti con autoimmunità β -cellulare e che tali alterazioni precedono l'esordio clinico della malattia. Naturalmente, studi clinici di grandi dimensioni e di durata adeguata saranno necessari per identificare e caratterizzare il legame tra microbioma intestinale e autoimmunità β -cellulare.

In conclusione, alla luce di quanto riportato, è possibile affermare che il microbioma intestinale rappresenta un potenziale bersaglio di terapie farmacologiche e/o dietetiche per numerose patologie metaboliche e immuno-mediate, oltre a costituire, a sua volta, un'ipotetica fonte di nuovi agenti bioattivi e di molecole con proprietà terapeutiche.

Bibliografia

- Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4: 430–435, 1996.
- Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489: 231–241, 2012.
- Qin, J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65, 2010.
- Spor A, Koren O, Ley R. Unrevealing the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* 9: 279–290, 2011.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022–1023, 2006.
- Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P. et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci* 102: 11070–11075, 2005.
- Yatsunenkov T, Rey FE, Marary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222–227, 2012.
- Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328: 228–231, 2010.
- Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB. The role of the immune system in governing host microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol* 14: 660–667, 2013.
- Goto Y, Ivanov I. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. *Immunol Cell Biol* 91: 204–214, 2013.
- Frantz AL, Rogier EW, Weber CR, et al. Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymetric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunol* 5: 501–512, 2012.
- Wells JM, Rossi O, Meijerink M, et al. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 4607–4614, 2011.
- He B, Xu W, Santini PS, et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A2 class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26: 812–826, 2007.
- Belkaid Y, Naik S. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. *Nat Rev Immunol* 14: 646–653, 2013.
- Hill DA, Artis D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol* 28: 623–667, 2010.
- Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest* 119: 2441–2450, 2009.
- Wohlfert E, Belkaid Y. Plasticity of Treg at infected sites. *Mucosal Immunol* 3: 213–215, 2010.
- Cani PD, Delzenne NM. The role of gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* 15: 1546–1558, 2009.
- Backhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15718–15723, 2004.
- Denechaud PD, Dentin R, Girard J, et al. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 582: 68–73, 2008.
- Tremaroli V, Backed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489: 242–249, 2012.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027–1031, 2006.
- Neal MD, Leaphart C, Levy R, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol* 176: 3070–3079, 2006.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761–1772, 2007.

25. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470–1481, 2008.
26. Wang Z, Xiao G, Yao Y, et al. The role of bifidobacteria in gut barrier function after thermal injury in rats. *J Trauma* 61: 650–657, 2006.
27. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50: 2374–2383, 2007.
28. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, et al. Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2272–2279, 2007.
29. Abu-Shanab A, Quigley EMM. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7: 691–701, 2010.
30. Creely SJ, Mc Ternan PG, Kusminski CM, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E740–747, 2007.
31. Goodlad RA, Lenton W, Ghatei MA, et al. Effect of an elemental diet, inert bulk and different type of dietary fibre on the response of the intestinal epithelium to refeeding in the rat and the relationship to plasma gastrin, enteroglucagon, and PYY concentrations. *Gut* 28: 171–180, 1987.
32. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, et al. Effect of prebiotic supplementation and calcium intake on body mass index. *J Pediatr* 151: 293–298, 2007.
33. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490: 55–60, 2012.
34. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498: 99–103, 2013.
35. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth GS. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464: 1293–1330, 2010.
36. Van Belle TL, Coppieters KT, Von Herrath MG. Type 1 diabetes: Etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91: 79–118, 2011.
37. Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The “perfect storm” for type 1 diabetes: The complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* 57: 2555–2562, 2008.
38. Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 31: 368–376, 2009.
39. Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, et al. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 48: 1565–1575, 2005.
40. Takiishi T, Korf H, Van Belle TL, et al. Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice. *J Clin Invest* 122: 1717–1725, 2012.
41. de Goffau MC, Luopajarvi K, Knip M, et al. Fecal microbiota composition differs between children with β -cell autoimmunity and those without. *Diabetes* 62: 1238–1244, 2013.

