

L'ALTRA PARTE DI NOI – IL MICROBIOMA UMANO

PAOLO LANDINI (*)

Nota presentata dal m.e. Enrica Galli
(Adunanza del 2 maggio 2013)

SUNTO. – L'importanza dei microrganismi associati all'uomo, il cosiddetto "microbioma umano", appare sempre più chiara da recenti studi scientifici. Che alcuni microrganismi potessero avere un effetto benefico su processi come la digestione e l'efficienza del sistema immunitario era noto da molti anni, anche se i meccanismi specifici non sono mai stati studiati a fondo. Tuttavia, negli ultimi anni, la prevalenza di microrganismi benefici rispetto a microrganismi dannosi, sebbene non agenti patogeni o causa diretta di infezioni, è stata messa in relazione con stati patologici quali l'obesità, il morbo di Crohn, l'aterosclerosi, ed altre malattie in cui non era mai stata ipotizzata una componente batterica. In questa relazione descrivo i concetti fondamentali legati alla definizione di microbioma e le potenziali ricadute dello studio dei meccanismi legati alla relazione microbioma-uomo sulla cura di alcune malattie.

ABSTRACT. – The importance of microorganisms associated with man, the so-called "human microbiota" has become increasingly clear from recent scientific studies. Although it has been known for many years that some microorganisms might have a beneficial effect on processes such as digestion or on the immune system, the specific mechanisms of these phenomena have never been thoroughly studied. However, in recent years the prevalence of either beneficial microorganisms or harmful bacteria, even though not strictly pathogenic, has been associated with pathological conditions such as obesity, Crohn's disease, atherosclerosis, and other diseases in which a bacterial component had never been implicated. In this report, I describe the main concepts related to the definition of microbiome and the potential impact of studying the mechanisms of man-microbiome interaction on the treatment of several illnesses.

(*) Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Italy.
E-mail: paolo.landini@unimi.it

1. INTRODUZIONE E CONCETTI GENERALI

Difficilmente, se ci venisse chiesto di definire noi stessi con una sola parola, verrebbe in mente di rispondere. “io sono un ecosistema”.

Eppure, questa definizione fotograferebbe in maniera molto accurata almeno un aspetto fondamentale di ognuno di noi, e cioè che, al di là del nostro concetto di identità ed univocità, noi ospitiamo uno straordinario numero di esseri viventi microscopici, prevalentemente batteri, per cui rappresentiamo, appunto, il loro ecosistema. Mentre fino a pochi anni fa questa presenza sembrava solo costituire un “incidente di percorso”, cioè un evento di scarsa importanza per la nostra vita, recentemente è apparso sempre più chiaro che i nostri “ospiti”, i microrganismi che vivono sul nostro corpo e dentro di esso, non molto diversamente da come noi viviamo sul pianeta terra, hanno un’incidenza fondamentale sulla nostra vita, sulla nostra salute e persino sulla nostra individualità. Questi microrganismi, nel loro complesso, vengono definiti il *microbioma umano*, e costituiscono quindi “l’altra parte di noi”.

Il nostro corpo non è mai privo di microrganismi, se non durante il periodo fetale. Ben pochi infatti sono i batteri che riescono a passare la barriera placentare; non appena il feto esce dall’utero inizia la colonizzazione del suo corpo da parte dei batteri che vivono in simbiosi con la madre. La colonizzazione batterica del corpo del bambino ha luogo *in primis* tramite l’allattamento al seno e si perfeziona nel corso dei primi tre anni di vita grazie al rapporto con l’ambiente esterno, con il contatto interumano, con il contatto con gli animali da compagnia, con il contatto con il cibo, etc. Questa fase, probabilmente, in maniera curiosamente simile a ciò che avviene con i nostri processi di apprendimento, determina in modo difficilmente reversibile quali microrganismi ci accompagneranno per tutta la vita. In questo senso, tipo di alimentazione (es. latte materno o latte artificiale) ed episodi quali un trattamento con antibiotici per curare un’infezione, evento che costituisce un elemento di selezione del microbioma, possono determinare quali batteri saranno i nostri primi pionieri e colonizzatori di successo.

Alla fine di questa prima fase, il microbioma raggiunge la sua massima espansione, e questa dimensione verrà mantenuta, a grandi linee, per il resto della vita dell’individuo che lo ospita. Il numero di cellule batteriche arriva ad essere 10 volte tanto quello delle cellule “umane”. Per capire meglio il senso di questa sproporzione apparentemente quasi

paradossale, va però ricordato che la cellula batterica è quasi mille volte più piccola di una cellula umana. Quindi, un confronto che dà meglio il senso del rapporto tra cellule umane e batteriche è il loro peso totale, che è quantificato intorno al 1.5-2 Kg di cellule batteriche in un individuo dal peso di 70 Kg. Il peso delle cellule batteriche rappresenta in un uomo quindi il 2-3% del totale: questo resta un valore consistente, paragonabile al peso di un organo come il fegato. E questo paragone con un organo coglie anche l'estrema utilità delle cellule batteriche per la nostra salute, tale appunto da poterle comparare ad un organo aggiuntivo, benché “diffuso”, cioè privo di una localizzazione univoca, all'interno del nostro corpo.

Le funzioni, o comunque i contributi di questo “organo” rappresentato dal microbioma batterico sono oggetto di studio e non sono ancora state del tutto comprese. Sicuramente le cellule batteriche, particolarmente quelle del *microbioma intestinale*, che si trovano nel nostro organo digerente, contribuiscono grandemente al controllo dell'utilizzo di sostanze nutritive ed alla produzione di molecole per noi indispensabili, quali numerose vitamine. Mentre questo ruolo è assodato ed è stato studiato e compreso in dettaglio già da molti anni, altre funzioni sono ancora oggetto di dibattito, ed includono la capacità del microbioma umano di interagire con il sistema immunitario, indirizzandolo a riconoscere e distinguere “amici” e “nemici”, a determinare la predisposizione ad alcune malattie quali l'aterosclerosi, e persino ad influenzare il carattere e la personalità, e di svolgere un ruolo nell'insorgenza di disturbi psichici e neurodegenerativi.

Una conseguenza diretta di quanto appena affermato è che l'organo rappresentato dal microbioma batterico può funzionare in maniera utile all'organismo umano, favorendone il benessere e lo stato di salute, o può, tramite un mancato o alterato funzionamento, contribuire a determinare uno stato di malattia. Chiaramente, la domanda che ci si pone è: cosa determina il buon funzionamento del microbioma umano? E la risposta più probabile è: la sua composizione in termini di specie batteriche. La prevalenza di specie utili determinerà uno stato di salute ed un contributo netto positivo del microbioma, mentre la loro assenza porterà ad uno stato di disequilibrio metabolico e di possibile malattia. Esisterebbe quindi una composizione “giusta”, o desiderabile di un insieme di microrganismi a noi utili. L'alterazione di questa composizione viene definita come *disbiosi* e può avere conseguenze deleterie sulla nostra salute.

2. LA COLLOCAZIONE E LA COMPOSIZIONE DEL MICROBIOMA UMANO

Se noi immaginiamo il corpo di ciascuno di noi come un ecosistema, paragonandolo al nostro pianeta terra, ci riesce facile comprendere come la distribuzione del microbioma possa essere molto diversificata, così come la distribuzione delle forme di vita sul pianeta terra è molto diversa a seconda delle aree climatiche, nelle aree di terra rispetto al mare, etc. Tipicamente troveremo una maggiore concentrazione di esseri viventi, animali e vegetali, in aree dal clima temperato e dove siano disponibili maggiori concentrazioni di sostanze nutritive o utili per la crescita delle piante. Quindi troviamo ad esempio un basso numero di organismi viventi nelle regioni desertiche, contrapposte ad aree più ricche di fauna e flora, che troviamo in corrispondenza con la presenza abbondante di acqua. Il nostro corpo presenta una simile alternanza di aree densamente popolate ed aree semidesertiche: tra queste ultime ci sono grandi tratti dell'epidermide, particolarmente quelle aree con meno sudorazione, in cui la secchezza dell'ambiente rende difficile la colonizzazione batterica. La presenza di acqua (o umidità) e di sostanze nutritive sono invece garanzia di un'elevata concentrazione di cellule batteriche, che si concentrano quindi nel tratto boccale e soprattutto nel nostro intestino. Il microbioma intestinale rappresenta pertanto la componente più importante della popolazione batterica che ospitiamo.

Proseguendo nella similitudine dell'ecosistema uomo/pianeta terra, anche aree meno ricche di forme di vita sono comunque colonizzate da organismi che si sono adattati a condizioni difficili o addirittura estreme: nelle aree aride del pianeta terra troviamo ad esempio organismi specializzati e resistenti alla scarsità di acqua (es. piccoli arbusti o piante grasse). Allo stesso modo, l'epidermide nelle sue aree più aride è colonizzata da batteri del gruppo dei Gram positivi, stafilococchi e streptococchi in particolare, resistenti alle condizioni secche che la caratterizzano. Al contrario, le aree più ricche di acqua e sostanze nutritive presentano un'enorme *biodiversità*, cioè la presenza di un enorme numero di specie batteriche diverse.

Oltre alla diversità legata ai diversi distretti anatomici, esiste, come si è detto, una diversità individuale che può arrivare ad una deviazione consistente in termini di composizione del microbioma, tale da alterare la funzione di questo "organo" aggiuntivo del nostro corpo. Queste variazioni derivano da una varietà di fattori (vedi *Fig. 1*

Turnbaugh *et al.*, 2007, Nature) che determinano differenze individuali che comunque non alterano il cosiddetto *core microbiome* cioè quel gruppo di microrganismi che troviamo regolarmente in tutti gli individui. I fattori di variazione nel microbioma sono riassunti nella Fig. 1, e comprendono tra gli altri la dieta, l'età, il genere, condizioni ambientali ed anche fattori genetici. Quando si arriva ad alterare in modo significativo il core microbiome, ad esempio tramite una terapia antibiotica aggressiva, si può parlare di disbiosi.

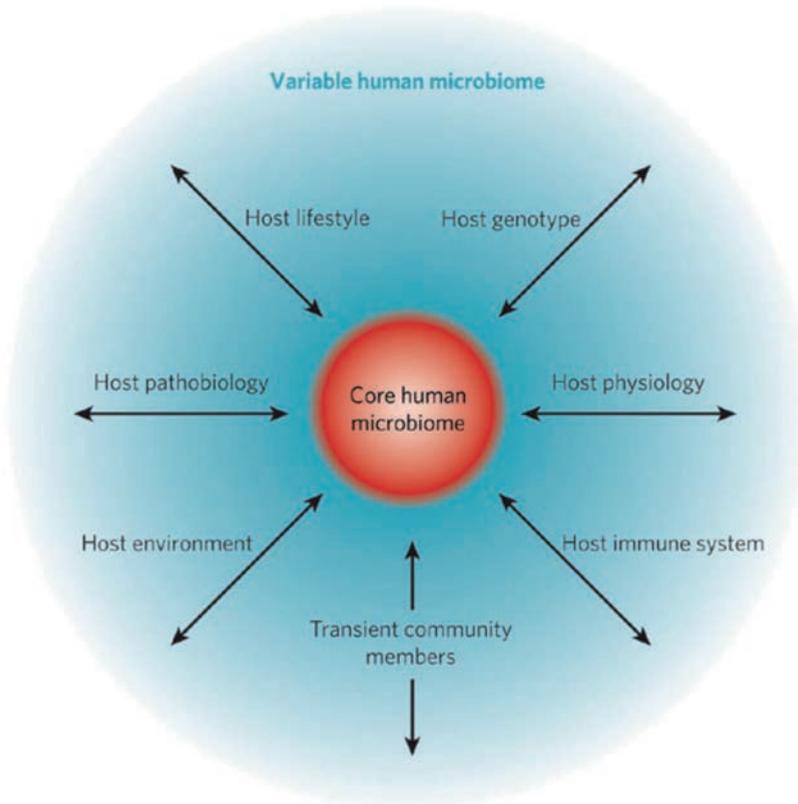


Fig. 1 – Concetto di core microbiome (vedi testo) e fattori che risultano nella variabilità della composizione individuale del microbioma.

Tratto da Turnbaugh *et al.*, 2007; *Nature*, Vol. 449, pp. 804-810.
Immagine liberamente distribuibile e non protetta da copyright.

La ricerca si è concentrata, negli ultimi anni, a fare un censimento delle diverse specie batteriche e della loro numerosità relativa, per stabilire una correlazione tra quali microrganismi sono presenti in condizioni di salute e di malattia e quindi per individuare quali microrganismi possano essere particolarmente di beneficio per la nostra salute. Il problema tecnico alla base di questi studi è l'estrema numerosità delle cellule batteriche (stimata con larga approssimazione a 10^{14} cellule, cioè 100 bilioni di cellule) del microbioma intestinale, che rende impossibile identificare le cellule microbiche mediante tecniche classiche di microbiologia, cioè l'isolamento e la crescita di ciascun tipo di microrganismo in coltura.

Fortunatamente i progressi nel campo della manipolazione e del sequenziamento del DNA, uniti all'avanzamento delle metodologie bioinformatiche, hanno consentito di superare questo problema, permettendo di identificare i microrganismi, e di determinare la loro quantità relativa, senza la necessità di isolarli, ma tramite il sequenziamento del DNA *metagenomico*. Il sequenziamento del DNA consente di leggere le quattro "lettere" che lo compongono e la cui alternanza costituisce il linguaggio della vita in ogni organismo vivente. Questo approccio consente di studiare l'insieme di tutto il materiale genetico (detto *metagenoma*), complessivamente derivante dalle diverse specie presenti in un determinato ambiente, quindi, nel nostro caso, dall'insieme dei microrganismi presenti nell'intestino o nel cavo boccale di una persona. Lo schema generale di questa strategia è mostrato nella Fig. 2. In aggiunta all'identificazione dei microrganismi, il sequenziamento metagenomico fornisce importanti informazioni sulla natura dei geni presenti nel metagenoma del microbioma umano. Vale la pena ricordare che le analisi metagenomiche hanno permesso di stabilire che il totale dei geni presenti sui genomi del microbioma umano si avvicina ai 5-6 milioni, il che significa un rapporto di circa 200:1 tra geni batterici e geni umani, che non superano probabilmente i 30.000. Il sequenziamento metagenomico costituisce una miniera di informazioni che ci consentirà in un prossimo futuro di avere un'idea molto precisa di tutte le reazioni metaboliche che avvengono nel nostro organismo, e che vengono svolte dal nostro "organo supplementare", cioè dal microbioma.

ANALISI GENOMICA DELLA COMUNITA' MICROBICA ASSOCIATA ALL' UOMO (MICROBIOMA UMANO)

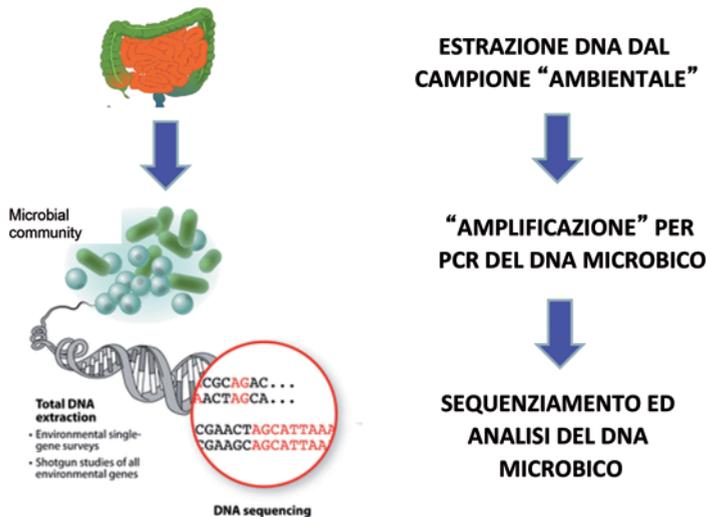


Fig. 2 – Schema di un sequenziamento del DNA metagenomico.

Il metagenoma intestinale può essere identificato da un campione rappresentativo (es. dalle feci). Il materiale genetico viene estratto direttamente da questo campione ed analizzato in laboratorio mediante la sua "amplificazione" (da ogni molecola di DNA vengono prodotte copie multiple mediante reazioni enzimatiche) ed il suo sequenziamento.

3. DISBIOSI E MALATTIA: CAUSA O EFFETTO?

Come accennato precedentemente, i recenti studi sul microbioma hanno mostrato una correlazione tra alterazione nel microbioma (disbiosi) e una serie di malattie che non erano mai state precedentemente associate a microrganismi, tra cui: l'obesità, l'aterosclerosi ed altre malattie cardiovascolari, l'artrite reumatoide ed altre malattie autoimmuni, e persino malattie neurodegenerative e complesse sindromi quali l'autismo. Per tutte queste malattie, si è verificato che il microbioma intestinale dei soggetti malati differisce sostanzialmente da quello dei soggetti sani, con arricchimento in alcune specie microbiche ed impoverimento di altre. Ad esempio, l'incremento della presenza del

phylum dei Firmicutes correla positivamente con l'obesità, mentre una presenza più marcata del *phylum* dei Bacteroidetes è stata rilevata negli individui normopeso o negli individui obesi dopo l'introduzione di un regime di dieta che ha portato ad una perdita rilevante di peso.

Uno delle conseguenze fondamentali di questo tipo di osservazioni è riassumibile nella domanda: le variazioni del microbioma sono una *causa o un effetto* dello stato di salute? In altre parole, è lo stato di salute/malattia a selezionare per certe categorie di microrganismi o sono questi ultimi, tramite la loro attività metabolica e l'interazione con l'ospite (ad esempio, con il suo sistema immunitario) ad innescare la malattia? E se questa seconda ipotesi è vera, come si origina la disbiosi originaria che porta alla malattia?

Una risposta, seppur parziale, viene da alcuni esperimenti effettuati su animali da laboratorio (prevalentemente su topi) in cui si è potuto alterare in maniera controllata la flora microbica intestinale. Si è rilevato che queste alterazioni, ad esempio arricchimento di Firmicutes o di Bacteroidetes, poteva influenzare significativamente l'acquisto o la perdita di peso, suggerendo che il microbioma possa essere causa (o quantomeno concausa) di una tendenza all'obesità.

Disbiosi possono essere create da trattamenti con antibiotici: sebbene questi trattamenti eliminino in teoria la flora microbica in maniera indiscriminata, in realtà essi finiscono per selezionare la flora microbica, eliminandone del tutto alcune specie senza intaccarne in modo significativo altre. I microrganismi sopravvissuti ad un trattamento antibiotico avrebbero poi campo libero nella colonizzazione dell'ospite. In questo modo, specie microbiche generalmente minoritarie nel microbioma potrebbero prendere il sopravvento, determinando quindi una disbiosi.

Un caso eclatante dove si può ravvisare un ruolo del microbioma contemporaneamente come causa ed effetto di una malattia non infettiva è il morbo di Crohn. Questa malattia consiste nell'iper-infiammazione cronica delle mucose del tratto gastrointestinale, ed è considerata multifattoriale, cioè dipendente da fattori genetici ed ambientali, quali l'alimentazione, lo stress, lo stile di vita. Oltre a produrre una sintomatologia semi-invalidante, il morbo di Crohn predispone anche al carcinoma del colon e ad altre forme di cancro; non sono conosciute terapie risolutive della malattia, che resta cronica per tutta la durata della vita del paziente. E' stato evidenziato come alcune mutazioni genetiche predispongano all'insorgenza di questa malattia. Recentemente, si è osser-

vato come la presenza di alcuni particolari varianti del batterio *Escherichia coli* siano molto più numerosi nei pazienti del morbo di Crohn rispetto agli individui non affetti da questa patologia. Queste osservazioni, e studi molecolari più dettagliati condotti in seguito, hanno portato ad elaborare l'ipotesi che mutazioni genetiche associate al Crohn inducano la produzione di una proteina da parte delle cellule epiteliali dell'intestino. Questa proteina può fungere da *recettore* per questo tipo di *Escherichia coli*, creando un ambiente favorevole a questo batterio e stimolando così la sua proliferazione nel tratto intestinale. A loro volta, questi batteri invadono le cellule epiteliali e producono molecole che innescano la risposta infiammatoria, andando a creare un circolo vizioso che sfocia nella malattia.

Recentemente sono state identificate alcune delle molecole prodotte da *Escherichia coli* responsabili per la forte stimolazione della risposta infiammatoria durante l'invasione delle cellule epiteliali quali il c-di-GMP (Fig. 3).

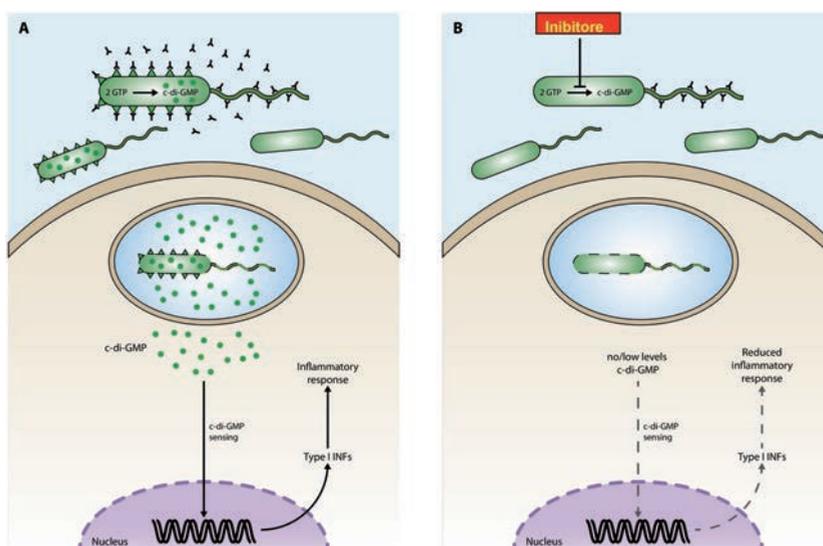


Fig. 3 – Possibile strategia di inibizione di molecole prodotte dal batterio *Escherichia coli* ed in grado di innescare l'infiammazione nell'uomo.

La molecola presa ad esempio è il c-di-GMP, una molecola derivata dal GTP, che si trova comunemente in tutte le cellule viventi. Al contrario, il c-di-GMP è una molecola esclusivamente prodotta dai batteri e può innescare reazioni infiammatorie a partire da cellule che vengono in stretto contatto con il batterio.

Inibendone la produzione nel batterio si blocca sul nascere l'insorgenza dell'infiammazione.

Questa scoperta suggerisce che inibitori della sintesi di questi induttori dell'infiammazione possano essere agenti terapeutici potenzialmente interessanti nella terapia del morbo di Crohn. Questa possibile applicazione rappresenta solo l'esempio di un utilizzo, che sarà sempre più probabile e frequente in futuro, di una nuova classe di agenti antimicrobici che, diversamente dagli antibiotici utilizzati attualmente, sarà mirata non all'eliminazione indiscriminata dei microrganismi, ma al loro "disarmo selettivo". In altre parole, queste molecole avranno come bersaglio specifico specie selezionate di microrganismi con la finalità di modularne la fisiologia, in un contesto di cura di malattie non infettive. Un approccio alternativo e complementare sarà l'utilizzo di *probiotici*, cioè microrganismi "buoni", che possano controbilanciare una particolare disbiosi e contribuire al ripristino di uno stato di buona salute.

CONCLUSIONI

Le recenti scoperte nel campo del microbioma umano stanno rivoluzionando l'approccio terapeutico a diverse malattie e sono giunte a mettere in discussione i nostri concetti più basilari sulle cause di salute e malattia nell'uomo. Anche lo stesso concetto di organismo uomo dovrà in qualche modo essere integrato dal riconoscimento dell'esistenza di un *meta-organismo* che comprende "l'altra parte di noi", cioè il microbioma. Questi nuovi concetti porteranno a sviluppi molto interessanti nella biomedicina negli anni a venire, ed alla creazione di nuove generazioni di farmaci mirate a risolvere malattie non infettive modulando la popolazione batterica residente nel nostro organismo.