Massimo Marzorati*, Tom Van De Wiele*

Simbiosi nell’uomo e potenziali applicazioni

I BATTERI E IL CORPO UMANO

I batteri sono una delle forme di vita più antica sulla terra. Grazie alle pressoché infinite capacità metaboliche, i batteri sono in pratica ubiquitari e dominano qualunque ambiente. Sono riusciti ad adattarsi alle più diverse condizioni ambientali e interagiscono con qualunque forma vivente sul nostro pianeta (Mc Arthur, 2006). L’esempio principale d’interazione tra batteri e ospite è l’uomo. Questa vastissima comunità microbica è composta di circa diecimila miliardi di cellule (un fattore 10 in più rispetto al numero di cellule umane), più di mille differenti specie che interagiscono con il nostro corpo stimolando il sistema immunitario, collaborando nel processo digestivo, proteggendoci da eventuali patogeni, producendo sostanze che possono promuovere il nostro benessere o al contrario possono risultare dannose per l’organismo. La massa di batteri nel nostro corpo pesa all’incirca 1.5 kg. Fondamentalmente è corretto descrivere l’uomo come un’associazione di materiale genetico presente nel genoma dell’uomo stesso (circa 30.000 geni) e nel genoma dei batteri (2-4 milioni di geni) che vivono nel nostro corpo (microbioma). Questa profonda relazione prende il nome di mutualismo (Parfrey et al., 2011). È interessante notare come, nonostante una certa variabilità tra individui, esiste una definita comunità di batteri che si ritrova in tutti gli individui indipendentemente dalla dieta che questi consumano, dal loro stile di vita o dal luogo della terra in cui vivono. In pratica, nei millenni l’uomo si è co-evoluto con delle forme batteriche creando una vera e propria simbiosi in cui entrambe le parti traggono un beneficio reciproco.

---

* *Laboratory of Microbial Ecology and Technology (LabMET), Ghent University*

Qualunque distretto corporeo è colonizzato da batteri a partire dal momento stesso in cui veniamo al mondo (Blackburn et al., 2007). In questa introduzione riporteremo qualche esempio di come i batteri colonizzino il nostro corpo e di quale ruolo possano avere. Ci focalizzeremo poi specificamente sul tratto gastrointestinale una degli ambienti con la più alta concentrazione di batteri.

La colonizzazione della pelle, così come quella del cavo orale, da parte dei batteri inizia al momento del parto attraverso il passaggio nel canale vaginale. Sebbene nei primi giorni di vita la pelle risulti essere scarsamente popolata, dopo sole 6 settimane alcune aree del corpo (es. ascelle o basso ventre) hanno una comunità microbica paragonabile a quella di un adulto. Dal punto di vista dei microorganismi, i bulbi piliferi e i follicoli rappresentano la via principale d'ingresso nell'epidermide, anche se in questa regione diverse ghiandole sono in grado di produrre sostanze antibatteriche e acidificanti. In generale comunque la pelle non è una superficie semplice da colonizzare per i batteri grazie alla barriera formata dal continuo strato di cheratina, la disponibilità di acqua limitata, il pH acido e il fatto di essere costantemente esposta a stress meccanici e ambientali. Per questa ragione, la pelle è principalmente colonizzata da batteri Gram+ (tra questi *Staphilococcus epidermidis* è il dominante) in grado di resistere meglio alle condizioni ambientali descritte. Al contrario, i batteri Gram- non sono normalmente identificati sulla pelle, con l'eccezione di *Acinetobacter* spp. nelle zone più umide. In generale comunque la composizione e la densità dei batteri sulla pelle è molto variabile se si considerano diversi siti anatomici. Un fattore chiave che determina la concentrazione di batteri sulla pelle sono le ghiandole sebacee e sudorifere in grado di secernere nutrienti e acqua per i batteri. Una caratteristica fondamentale della comunità microbica della cute è l'azione di prevenzione nei confronti di potenziali patogeni. Quest'azione avviene attraverso una competizione diretta per spazio e nutrienti e la produzione di sostanze antibatteriche (H_2O_2, acido lattico, acido acetico, antibiotici, batteriocine...) (Wilson, 2005).

Come la pelle, anche il cavo orale, con una superficie di circa 200 cm^2 (di cui il 20% è rappresentato dai denti), è abitato da una vasta comunità microbica associata alla mucosa orale. Dal momento che la funzione della bocca è legata alla masticazione dei cibi, la relativa comunità microbica è soggetta a notevoli stress meccanici e idrodinamici. Inoltre, la saliva è ricca di proteine in grado di coagulare i batteri presenti nel cibo che, restando in sospensione, sono quindi ingeriti. Inoltre la saliva contiene numerose sostanze antimicrobiche e immunoglobulina A. Da ultimo l'epitelio del cavo orale è ricco di linfociti e cellule di Langerhans, pronti a iniziare una specifica difesa immunitaria. Pertanto, la comunità microbica della bocca è adattata a vivere sotto la pressione selettiva di numerosi fattori ambientali: stress meccanico, nutrienti derivati dalla saliva e dalla mucosa, stress fisico-chimico (cambiamenti in pH o temperatura durante l'assunzione di cibo). Nonostante ciò, più di 200 differenti specie batteriche sono state isolate dalla cavità orale e tecniche molecolari hanno mostrato la presenza di circa 700 filotipi. Tra questi i più abbondanti sono le specie batteriche in grado di aderire efficientemente ai recettori presenti nella mucosa, sul tratto gengivale e la superficie dei denti: *Streptococcus sanguis*, *Strep. Oralis*, *Strep. mitis* biovar 1, *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Actinomyces* spp., e streptococci. Questi colonizzatori principali hanno un importante ruolo ecologico in quanto sono in grado di consumare l'ossigeno presente degradando le macromolecole prodotte dall'ospite. In questo modo creano le condizioni ambientali necessarie per i colonizzatori secondari, come *Fusobacterium nucleatum*, in grado di aderire agli altri batteri presenti nel biofilm batterico creando strette interazioni metaboliche (Wilson, 2005).

Anche il tratto respiratorio è colonizzato da batteri. In media un adulto respira circa 10.000 litri di aria al giorno e con essa un enorme numero di particelle e batteri. Dal momento che questo sistema è molto sensibile, numerosi sistemi di difesa agiscono a sua protezione. In primis, l'azione meccanica delle mucocilie imprigiona i batteri in un sottile strato di muco che viene in seguito ingerito o eliminato. A quest'azione meccanica, si aggiunge la produzione costitutiva di peptidi ad azione anti-microbica (es: lisozima e lattoferrine) e acido nitrico. Nonostante questi meccanismi, numerose sono le specie batteriche che vivono nell'apparato respiratorio riuscendo ad aderire sulla superficie ricoperta di muco. Tra queste, Streptococci, *Strep. pyogenes*, *Strep. pneumoniae*, *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Moraxella* spp., *Staph. aureus*, *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Prevotella* spp., Mollicutes (*Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp.), e *Porphyromonas* spp. (Wilson, 2005).

Da ultimo, un altro interessante esempio è rappresentato dal sistema riproduttivo femminile in cui, la comunità batterica associata alla vagina gioca un ruolo fondamentale per la salute della donna. Infatti, questi microorganismi – per la maggior parte lactobacilli – grazie a una corposa produzione di acido lattico contribuiscono a mantenere il pH vaginale acido, creando un ambiente ostile per l'invasione di patogeni. Inoltre la presenza di pH acido è anche dovuta al metabolismo del glicogeno presente nelle cellule epiteliali. Quando questa comunità batterica viene disturbata è facile incorrere in possibili infezioni che portano alla cosiddetta vaginosi batterica. La comunità batterica di donne sane è principalmente formata dai seguenti generi: *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Can. albicans*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Veillonella e Gardnerella vaginalis* (Wilson, 2005).

Da questi brevi esempi, è evidente che i batteri vivono associati al corpo umano e che hanno un ruolo fondamentale in numerose attività. L'esempio più eclatante di ciò sarà analizzato nelle pagine successive: il tratto gastrointestinale, l'ambiente caratterizzato dalla più alta concentrazione di batteri nell'uomo.

IL TRATTO GASTROINTESTINALE

Il tratto gastrointestinale ospita una vastissima comunità microbica. Tutto il canale digestivo è massivamente colonizzato da batteri con una concentrazione crescente a partire dallo stomaco (circa 10^2-10^3 cellule batteriche per mL), dove la crescita dei batteri è limitata per la presenza di un ambiente particolarmente acido, fino al colon con una concentrazione di circa 10^{11}-10^{12} cellule batteriche per grammo di materiale fecale. Il tratto gastrointestinale di un adulto contiene organismi appartenenti a tutti e tre i dominii della vita: batteri, archea ed eucarioti. Sebbene siano state descritte 55 divisioni batteriche, solo 8 di queste sono state individuate fino a ora nel tratto gastrointestinale e due sono i phyla dominanti (Bacteroidetes e Firmicutes). A livello di divisioni batteriche, le comunità microbiche di tutti gli esseri umani appaiono molto simili. Tuttavia, se la stessa comunità viene analizzata a livello delle singole specie, il microbiota intestinale diventa a livello individuale personalizzato come un'impronta digitale.

Per molti anni si è pensato che la funzione principale del colon fosse esclusivamente di assorbimento di acqua e sali e preparazione del materiale fecale per essere espulso. Tuttavia, la ricerca condotta negli ultimi anni ha chiaramente dimostrato che questa fosse una visione estremamente semplificata del colon. Infatti, l'altissimo numero di batteri che risiedono nel colon ha un ruolo fondamentale per l'uomo, codificando per funzioni metaboliche coinvolte nella fermentazione di substrati che non possono essere digeriti dall'uomo, produzione di biomassa, di segnali molecolari o di molecole con funzione antimicrobica per aumentare la resistenza verso specifici patogeni, sintesi di vitamine fondamentali, stimolazione del sistema immunitario. In pratica, il microbiota intestinale è un organo aggiuntivo all'interno dell'uomo che, sotto la pressione di una selezione naturale si è co-evoluto con l'uomo, diventando in grado di codificare specifici percorsi metabolici che non si sono mai sviluppati nell'uomo stesso. D'altro canto, esistono prove che specifiche conformazioni del microbioma e specifici microorganismi possono essere correlati con situazioni negative per la salute umana, come per esempio obesità, allergie o gravi stati d'infiammazione (Possemiers et al., 2009).

La composizione unica di questo ecosistema è in relazione alla specifica organizzazione funzionale e la selezione naturale che avviene sia a livello microbico che dell'ospite. Questa selezione tende a promuovere una cooperazione mutuale tre le parti alla ricerca di una stabilità funzionale, in analogia con la teoria dell' 'Evolutionary Stable Strategy' (Blaser e Kirschner, 2007; Van den Abbeele et al., 2011). I batteri devono riuscire a superare le difese dell'ospite senza però arrecare un danno, fatto che ridurrebbe la possibilità per i batteri di prosperare nel nuovo *habitat*. Questa costante selezione avviene primariamente a livello della mucosa intestinale attraverso un costante scambio di segnali tra batteri e ospite. Il risultato è che solo quei batteri che vengono riconosciuti come amichevoli sono tollerati e riescono a interagire con l'ospite aderendo alla mucosa e secernendo specifici fattori solubili (es. analoghi di ormoni, omoserin lattone o altre molecole coinvolte nei processi di *quorum sensing*) che riescono a modulare la risposta immunitaria dell'ospite stesso impegnato a riconoscere i cosiddetti MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns).

'GASTROINTESTINAL RESOURCE MANAGEMENT' (GRM)

Lo sviluppo di tecniche molecolari avanzate ha permesso negli ultimi anni di approfondire la conoscenza del ruolo che i batteri possono avere all'interno del corpo umano. In termini economici, la comunità microbica può essere vista a seconda delle situazioni sia come *asset* o *liability*. Infatti, come descritto nel paragrafo precedente il rapporto tra comunità microbica e ospite è soggetto a un fine bilanciamento tra possibili aspetti positivi e negativi (fig. 1). Da qui l'importanza di riuscire a modificare queste interazioni – a livello sia di composizione che di attività metabolica della comunità microbica – in modo da favorire le possibili interazioni mutualistiche. Strategie atte a modificare queste interazioni possono basarsi sull'introduzione di una specie specifica o sul tentativo di modulare in generale l'ecosistema microbico. Un tipico esempio potrebbe essere l'uso di specifici ceppi batterici ingegnerizzati per produrre specifiche proteine immuno-modulatorie e che funzionano quindi come veicoli di vaccini a livello

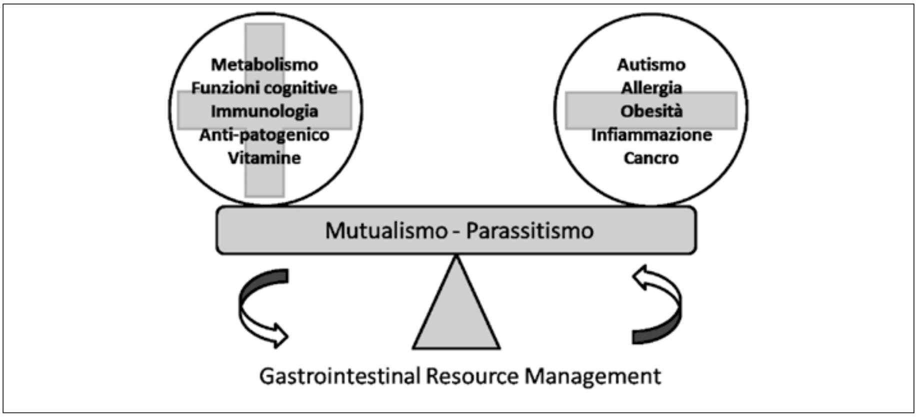

Fig. 1 *Visualizzazione del concetto di Gastrointestinal Resource Management, la modulazione del microbiota intestinale al fine di ottenere un effetto positivo per la salute dell'ospite*

della mucosa intestinale (Braat et al., 2006). In molti casi comunque, l'effetto finale sulla salute dell'uomo non può essere attribuito a una specie in particolare ma è il risultato di un'azione complessa che coinvolge diversi gruppi batterici che interagiscono con l'ospite a diversi livelli.

La capacità di modificare la struttura e l'attività della comunità microbica inducendo modifiche che possano essere positive per la salute dell'ospite è stata recentemente definita come 'Gastrointestinal Resource Management' (GRM), gestione delle risorse microbiche intestinali (Marzorati et al., 2010a). Il concetto di GRM è in stretta assonanza con il ben più noto 'Human Resource Management' (gestione delle risorse umane): all'interno di un'azienda si deve cercare di favorire le migliori interazioni possibili tra i dipendenti in modo che tutti possano rendere al massimo, massimizzando il ritorno economico per l'azienda stessa. Allo stesso modo, il concetto di GRM implica la capacità di ottimizzare i percorsi metabolici della comunità microbica intestinale al fine di ottenere un effetto positivo per la salute dell'ospite.

Se il corpo umano viene considerato con il suo complesso microbioma, le possibilità "terapeutiche" diventano molteplici. Da un lato il gruppo di geni presenti nel microbioma intestinale è coinvolto nel metabolismo di quei prodotti che non vengono assorbiti durante la digestione, dall'altro codifica per una serie di fattori direttamente coinvolti nell'interazione con l'ospite, influenzandone la risposta immunitaria. Esistono molteplici possibilità per influenzare e modificare l'interazione tra batteri e ospite nel tratto gastrointestinale. L'approccio più comune risiede nel consumare i cosiddetti cibi funzionali (es: prebiotici, probiotici o sinbiotici). I prebiotici sono ingredienti alimentari, non digeribili, in grado di stimolare selettivamente la crescita o l'attività di una o di un limitato numero di specie batteriche utili nel colon, esercitando in questo modo un'azione benefica (Roberfroid, 2007). Tipici prebiotici sono fibre alimentari e oligosaccaridi che, non essendo digeriti dall'uomo, giungono nel colon intatti e possono essere fermentati dai batteri, producendo sostanze (acidi grassi a catena corta - SCFA) benefiche per l'organismo. Due SCFA sono di particolare interesse: il butirrato che agisce come fonte di energia per le cellule dell'epitelio intestinale e ha effetti protettivi contro infiammazione e cancro del colon; il propionato che ha un'azione locale simile al butirrato e inoltre, una volta assorbito, viene trasportato al fegato dove svolge un'azione di abbassamento del colesterolo e controllo della glicemia (Wong et al., 2006). Secondo la definizione ufficiale di FAO e OMS, i probiotici sono "organismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite" (FAO/WHO, 2001). Per la maggior parte si tratta di batteri lattici e bifidobatteri ma anche alcuni lieviti e bacilli possono essere utili. In generale questi batteri devono resistere alle difficili condizioni del tratto superiore del canale digestivo (pH acido dello stomaco e alta concentrazione di sali biliari nell'intestino tenue) per poter svolgere le loro funzioni benefiche nell'ileo e colon. La combinazione di un prebiotico e un probiotico prende il nome di sinbiotico. Un prodotto sinbiotico è caratterizzato dalla presenza di una fibra o fonte di carbonio altamente selettiva per il probiotico, massimizzando in questo modo l'azione di quest'ultimo.

È importante sottolineare il fatto che al di là di singole specie batteriche che possono direttamente avere un effetto positivo sulla salute dell'ospite, la struttura stessa della comunità microbica (diversità e abbondanza relativa delle singole specie) e la fitte rete di interazioni metaboliche giocano un ruolo fondamentale nell'attività del microbiota intestinale. Prova di ciò è il fatto che, in seguito a trattamenti con antibiotici che alterano il normale equilibrio della flora intestinale, numerose patologie o stati di malessere possono insorgere nell'ospite. L'esempio più eclatante sono le infezioni ospedaliere di *Clostridium difficile*, un patogeno in grado di causare diarrea e colite e in situazioni specifiche anche la morte del paziente (nel 2004, 23 casi di morte ogni milione di pazienti). *C. difficile* non è normalmente un patogeno di grande importanza in quando non riesce a mantenersi e competere contro un microbiota intestinale sano. Tuttavia, quando in seguito a trattamenti antibiotici consistenti la normale struttura del microbiota intestinale viene distrutta, *C. Difficile* riesce a prendere il sopravvento. In questi casi, un ulteriore trattamento antibiotico per debellare il patogeno può non essere sufficiente. Infatti, se da un lato la concentrazione del patogeno diminuisce in seguito all'azione dell'antibiotico, dall'altro permane la situazione di una comunità microbica altamente modificata (disbiosi) e quindi prona a nuove infezioni. Una possibile soluzione al problema è il trapianto del microbiota intestinale (attraverso uno o più enteroclismi di un campione fecale) da un individuo sano nel paziente che soffre di un'infezione ricorrente di *C. difficile*. Ristabilendo la normale microflora intestinale si ricreano le condizioni di competizioni tra microorganismi, *C. difficile* non è più in grado di proliferare e si raggiunge la remissione di tutti i sintomi clinici (Bakken et al., 2011). Il trapianto del microbiota intestinale è stato applicato con successo anche in casi di colite, costipazione grave e nella sindrome dell'intestino irritabile (Borody et al., 1989).

METODI DI STUDIO: IN VITRO/IN VIVO

Nel paragrafo precedente è stato introdotto il concetto di modificare il microbiota intestinale al fine d garantire un effetto positivo per la salute dell'ospite. Tuttavia, per modificare la microflora intestinale bisogna prima di tutto poterne studiare l'ecologia e capire come i batteri si comportano in determinate situazioni. Le domande fondamentali cui dare una risposta sono tre:

- Chi c'è? Le innovative tecniche molecolari attualmente disponibili permettono di analizzare in dettaglio la composizione del microbiota intestinale.
- Chi fa cosa? Non è solo importante sapere quale specie batteriche siano presenti. Bisogna anche capire quale di queste specie sono potenzialmente coinvolte nei percorsi metabolici che devono essere modificati per ottenere l'effetto sperato.
- Chi fa cosa con chi? Questa è la parte più complicata del lavoro perché spesso i giocatori coinvolti in un determinato processo sono molteplici e molteplici fattori devono essere presi in considerazione al fine di indurre un cambiamento metabolico che possa rappresentare un beneficio per l'ospite.

Nel momento in cui è possibile fornire una risposta a queste 3 domande si riesce a comprendere e quindi anche potenzialmente a gestire la comunità microbica intestinale e quei fattori che determinano il rispettivo agire mutualistico.

Esistono diverse possibilità per poter studiare l'effetto di un determinato prodotto sulla composizione e attività metabolica della comunità microbica intestinale. Lo standard di riferimento è rappresentato ovviamente da studi clinici su uomo. È intuitivo comprendere che, se si vuole immettere sul mercato un prodotto caratterizzato da una specifica attività sulla salute dell'uomo (*health claim*), si debba prima dimostrare la reale efficacia del prodotto nel contesto in cui verrà applicato. Tuttavia, questo genere di approccio è senza dubbio costoso e dispendioso in termini di tempo. Stesso discorso vale per gli studi condotti su animali con in aggiunta l'aspetto negativo che spesso la fisiologia dell'apparato digerente e la composizione della comunità microbica dell'animale impiegato nello studio (es. topo) sono totalmente diversi da quelle dell'uomo. Inoltre, entrambi gli approcci hanno una limitazione fondamentale in termini di comprensione del potenziale meccanismo d'azione di un determinato prodotto nel tratto gastrointestinale a causa della difficoltà intrinseca di collezionare campioni rappresentativi. Si parla quindi di *black box approach* ossia di un approccio in cui si riesce ad analizzare quello che viene inserito nel sistema e quanto ne esce ma senza sapere cosa accade esattamente nelle zone meno accessibili del tratto gastrointestinale (Marzorati et al., 2009).

Per poter sopperire a queste limitazioni degli studi in vivo, sono state sviluppate specifiche tecnologie in vitro, veri e propri simulatori del tratto gastrointestinale. Questi possono essere utilizzati in maniera complementare agli studi in vivo e l'operatore ha il vantaggio di poter semplicemente collezionare campioni per qualunque tipo di analisi. Ovviamente meglio un simulatore riesce a riprodurre la reale diversità e complessità del tratto gastrointestinale maggiore è il valore scientifico e commerciale dei risultati ottenuti. Tra tutti i simulatori sviluppati, il *Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem* (SHIME) è già stato impiegato più volte con successo in studi finalizzati alla comprensione del meccanismo di azione di un determinato prodotto e al suo impiego in termini di GRM (fig. 2). I dati ottenuti in questi studi sono stati poi validati anche con studi in vivo fornendo pertanto una prova della validità scientifica di questo sistema.

La piattaforma tecnologica dello SHIME è un modello dinamico del tratto gastrointestinale composto da 5 reattori che simulano in sequenza stomaco (diminuzione sigmoidale del pH e aggiunta di pepsina), intestino tenue (aggiunta di sali biliari, succo pancreatico, pH a 6.8/7 e simulazione dei processi di assorbimento di zuccheri semplici, aminoacidi e grassi) e le tre aree principali del colon: colon ascendente, trasverso e discendente (Marzorati et al., 2009). Gli ultimi tre reattori sono inoculati con una comunità microbica originata da un campione fecale. Attraverso un attento controllo dei parametri ambientali è possibile ottenere una comunità microbica stabile e altamente rappresentativa delle diverse zone del colon in vivo, sia in termini di composizione sia di attività metabolica. Un tipico esperimento tende a riprodurre i tempi e le condizioni caratteristiche de-

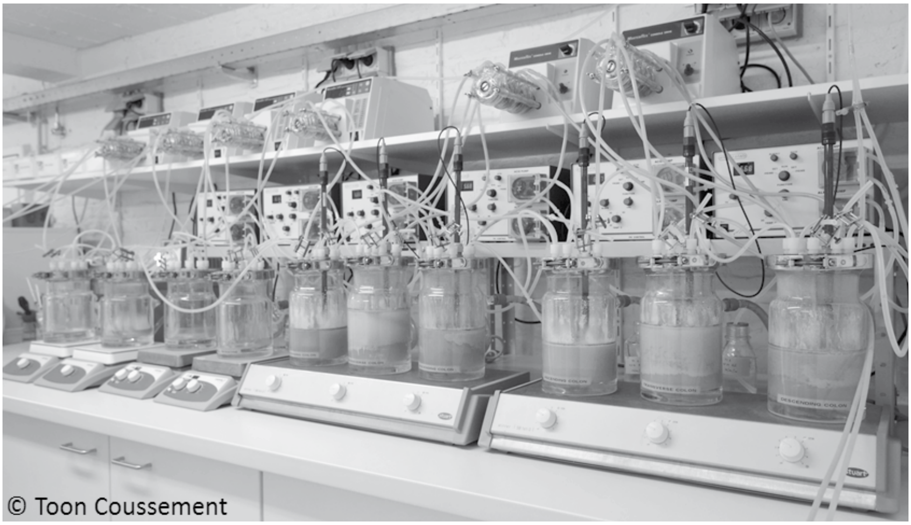
© Toon Coussement

Fig. 2 *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME)*

gli studi clinici in vivo: due settimane di controllo, con una dieta base, in cui si misurano tutti i parametri di base; tre settimane di trattamento per valutare l'impatto di un determinato prodotto (es: prebiotico, probiotico, ingrediente funzionale, farmaco...) sull'attività e composizione del microbiota intestinale; infine, due settimane di *washout* in cui si riutilizza la dieta base per valutare se i cambiamenti indotti dal trattamento restano o meno stabili nel tempo.

Da ultimo, recenti sviluppi tecnologici hanno permesso di espandere le possibilità di studio con lo SHIME al fine di poter valutare l'interazione tra ospite e microbiota. Due sono i fattori chiave da analizzare: da un lato la capacità dei batteri di aderire alla parete intestinale (normalmente protetta da uno strato di mucosa), dall'altro la capacità dei medesimi batteri di modulare la risposta dell'ospite in termini di stimolazione del sistema immunitario, pro- anti-infiammazione e permeabilità. Sono stati quindi sviluppati dei sistemi aggiuntivi che possono essere utilizzati in combinazione con lo SHIME al fine di valutare l'interazione tra ospite e microbiota: M-SHIME (Mucus-SHIME) e modulo HMI (*Host-Microbiota Interaction*). L'M-SHIME contiene un numero elevato di microcosmi in plastica ricoperti con uno strato di agar e mucina. In questo modo viene a formarsi una superficie simile alla mucosa intestinale su cui i batteri possono aderire. È così possibile studiare l'effetto di specifici trattamenti sulla frazione di batteri a maggior contatto con l'ospite (Van den Abbeele et al., 2012). Il modulo HMI è invece un reattore caratterizzato da due comparti separati da una membrana semipermeabile ricoperta con uno strato di agar e mucina. Il comparto superiore è una simulazione del lume intestinale e può essere utilizzato per studiare la formazione del biofilm batterico nel tratto gastrointestinale. Il comparto inferiore rappresenta l'ospite tramite linee cellulari di enterociti (Caco-2 o simili) e può essere utilizzato per studiare la potenziale risposta dell'ospite ai metaboliti batterici che permeano dal comparto superiore. In questo modo è possibile investigare l'adattamento dell'ospite nei confronti di uno specifico trattamento per un periodo di circa 48 h, il tempo in cui normalmente un enterocita è esposto sui villi al contenuto del lume intestinale (Marzorati et al., 2010b).

L'utilizzo combinato di queste tecnologie in vitro permette pertanto di aumentare il valore scientifico e commerciale dei risultati ottenuti e, come già detto, permette di comprendere il potenziale meccanismo di azione di determinati prodotti in un'area del corpo umano non facilmente raggiungibile. Nel prossimo paragrafo presenteremo alcuni esempi.

RUOLO DEL MICROBIOTA INTESTINALE: DATI IN VITRO E IN VIVO

In questo paragrafo finale riporteremo tre esempi (un prebiotico, un probiotico e un polifenolo estratto dalle piante) del potenziale ruolo positivo che i batteri ricoprono nel tratto gastrointestinale e di come l'uso combinato di studi in vivo e in vitro ha permesso di elucidare quest'attività.

Prebiotico

EpiCor (Embria, USA), un prodotto derivante dalla fermentazione del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, è stato associato, in alcuni studi clinici, alla modulazione del sistema immunitario. Tuttavia, nonostante si conoscesse l'effetto sistemico, il meccanismo d'azione a livello del tratto digerente rimaneva in gran parte sconosciuto. Uno studio di diverse settimane con lo SHIME, ha dimostrato che l'assunzione di dosi ripetute del prodotto (0.63 grammi/giorno) è in grado di modificare la comunità batterica intestinale sia a livello del lume che della mucosa intestinale (diminuzione di potenziali patogeni, aumento della concentrazione di lattobacilli e bifidobatteri). Inoltre, il trattamento è anche associato a un aumento della produzione di butirrato, un acido grasso a catena corta con riconosciuta attività immuno-protettiva. Studi con linee cellulari umane combinate con campioni prelevati dallo SHIME nel corso della sperimentazione hanno, in effetti, dimostrato una diminuita produzione di interleuchina 8, una citochina pro-infiammatoria. In conclusione, il microbiota autoctono è in grado di utilizzare il fermentato di lievito, producendo dei metaboliti che hanno un potenziale effetto positivo sulla salute dell'ospite (Possemiers et al., 2012).

Probiotico

Nel campo dei probiotici, un esempio interessante di utilizzo combinato di studi in vitro/in vivo è il caso dell'attività di abbassamento del colesterolo da parte di un ceppo di *Lactobacillus reuteri*, caratterizzato da un'alta attività idrolasica specifica per i sali biliari. Studi con lo SHIME hanno dimostrato che questo ceppo, quando aggiunto al sistema come un probiotico, è in grado di metabolizzare il colesterolo nell'ileo, modificandone quindi in teoria i livelli di assorbimento. Studi in vivo su maiali hanno, in effetti, dimostrato che quando *L. reuteri* viene addizionato alla dieta dell'animale è possibile osservare una diminuzione significativa di colesterolo totale e LDL (De Smet et al., 1998; De Boever et al., 2000).

Polifenoli

I fitoestrogeni sono composti di origine vegetale con attività estrogenica. Tuttavia le piante spesso contengono solo i precursori delle molecole con reale effetto biologico. È il caso dell'estratto di luppolo spesso utilizzato per alleviare gli effetti collaterali della menopausa. Questo estratto non sempre è efficacie e vi è una alta variabilità individuale. Studi *in vitro* hanno elucidato il perché: il precursore deve essere attivato per esercitare la necessaria attività biologica e questo avviene per opera di specifici microorganismi presenti nel tratto gastrointestinale. Non tutte le donne possiedono nel loro microbiota i microorganismi necessari alla conversione metabolica e questo spiega la diversa efficacia del medesimo prodotto (Possemiers et al., 2006). Studi in vivo su animali e uomo hanno poi confermato che l'esposizione finale alle molecole bioattive originate dai fitoestrogeni è strettamente dipendente dall'attività del microbiota intestinale (Bolca et al., 2007a; Bolca et al., 2007b).

CONCLUSIONI

I batteri e l'uomo si sono co-evoluti nei millenni stabilendo uno stretto rapporto di mutalismo e svolgendo funzioni fondamentali per il benessere dell'ospite. Tuttavia, i ritmi stressanti della vita moderna, una cattiva alimentazione, l'insorgere di specifiche malattie possono alterare questo sottile equilibrio rendendo il nostro micriobiota uno scomodo ospite all'interno dell'uomo. Comprendere i meccanismi che supportano questo equilibrio a livello di segnali biochimici e molecolari è un passo fondamentale per riuscire a gestire e migliorare l'interazione tra microbiota e ospite in termini di gastrointestinal resource management. A questo scopo, la possibilità di effettuare indagini scientifiche con studi in vivo e in vitro che si complementano a vicenda è una grande opportunità che l'avanzamento della tecnologia offre oggigiorno allo scopo di riuscire a comprendere quei processi gastrointestinali fondamentali per la nostra salute.

RINGRAZIAMENTI

Massimo Marzorati e Tom Van de Wiele sono finanziati dal FWO (Fondazione Fiamminga per la Ricerca - Belgio).

RIASSUNTO

Qualunque distretto corporeo (es. pelle, cavo orale, apparato respiratorio e riproduttivo...) è colonizzato da batteri fin dal momento della nascita. L'esempio più eclatante è il tratto gastrointestinale, ambiente caratterizzato da una concentrazione di batteri pari a 10^{11}-10^{12} cellule per grammo di materiale fecale. Questo organo addizionale all'interno del corpo umano ha un ruolo fondamentale codificando per funzioni metaboliche coinvolte nella fermentazione di substrati che non possono essere digeriti dall'uomo, produzione di biomassa, segnali molecolari o anti-microbici, sintesi di vitamine fondamentali, stimolazione del sistema immunitario. La possibilità di modificare il fine bilanciamento esistente tra ospite e microbiota al fine di ottenere un effetto positivo per la salute dell'ospite è stato recentemente definita come 'Gastrointestinal Resource Management'. Per poter gestire la comunità microbica intestinale e quei fattori che determinano il rispettivo agire mutualistico, è fondamentale poter rispondere a domande chiave come "Chi c'è?", "Chi fa cosa?" e "Chi fa cosa con chi?". La possibilità di effettuare indagini scientifiche con studi *in vivo* e *in vitro* che si complementano a vicenda è una grande opportunità che l'avanzamento della tecnologia offre oggigiorno allo scopo di riuscire a comprendere quei processi gastrointestinali fondamentali per la nostra salute.

ABSTRACT

Any body district (i.e. skin, mouth, respiratory tract, vagina…) is heavily colonized by bacteria since the birth. The most astonishing example is the gastrointestinal tract, which hosts a microbial community with a concentration of approx. 10^{11}-10^{12} cells per gram of fecal matter. This additional organ within the human body plays a key role, coding for metabolic functions involved in the catabolism of otherwise indigestible compounds, biomass production as well as production of molecular signals or anti-pathogenic peptides, synthesis of vitamins and stimulation of the immune system. The possibility of modulating the fine tuning that exists between the microbiota and its host - with the aim of obtaining a positive outcome for the host's health - has been recently defined as 'Gastrointestinal Resource Management'. In order to be able to manage such a complex ecosystem it is necessary to answer to some key questions: 'Who is there?'; 'Who is doing what?'; and 'Who is doing what with whom?'. The possibility of using complex and complementary *in vivo* and *in vitro* techniques to simulate and understand these key gastrointestinal processes is an opportunity that the technological advancement of the last years is offering to improve the human health.

BIBLIOGRAFIA

Bakken J.S., Borody T., Brandt L.J., Brill J.V., Demarco D.C., Franzos M.A., Kelly C., Khoruts A., Louie T., Martinelli L.P., Moore T.A., Russell G., Surawicz C., Fecal Microbiota Transplantation Workgroup. (2011): *Treating Clostridium difficile infection with Fecal Microbiota Transplantation*, «Clinical Gastroenterology and Hepatology», 9, pp. 1044-1049.

Blaser M.J., Kirschner D. (2007): *The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts*, «Nature», 449, pp. 843-849.

Bolca S., Possemiers S., Maervoet V., Huybrechts I., Heyerick A., Vervarcke S., Depypere H., De Keukeleire D., Bracke M., De Henauw S., Verstraete W., Van de Wiele T. (2007): *Microbial and dietary factors associated with the 8-prenylnaringenin producer phenotype: a dietary intervention trial with fifty healthy post-menopausal Caucasian women*, «British Journal of Nutrition», 98, pp. 950-959.

Bolca S., Possemiers S., Herregat A., Huybrechts I., Heyerick A., De Vriese S., Verbruggen M., Depypere H., De Keukeleire D., Bracke M., De Henauw S., Verstraete W., Van de Wiele T. (2007b): *Microbial and dietary factors are associated with the equol producer phenotype in healthy postmenopausal women*, «Journal of Nutrition», 137, pp. 2242-2246.

Borody T.J., George L., Andrews P., Brandl S., Noonan S., Cole P., Hyland L., Morgan A., Maysey J., Moore-Jones D. (1989): *Bowel-flora alteration: a potential cure for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome?*, «Medical Journal of Australia», 150, p. 604.

FAO/WHO (2001): *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation (http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/).

Braat H., Rottiers P., Hommes D.W., Huyghebaert N., Remaut E., Remon J.P., van Deventer S.J., Neirynck S., Peppelenbosch M.P., Steidler L. (2006): *A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease*, «Clinical Gastroenterology and Hepatology», 4, pp. 754-759.

De Boever P., Wouters R., Verschaeve L., Berckmans P., Schoeters G., Verstraete W. (2000): *Protective effect of the bile salt hydrolase-active Lactobacillus reuteri against bile salt cytotoxicity*, «Applied Microbioliogy and Biotechnology», 53, pp. 709-714.

De Smet I. De Boever P., Verstraete W. (1998): *Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity*, «British Journal of Nutrition», 79, pp. 185-194.

Marzorati M., Possemiers S., Verstraete W. (2009): *The use of the SHIME-related technology platform to assess the efficacy of pre- and probiotics*, «Agro Food Industry Hi-Tech», 20, pp. S50-S53.

Marzorati M., Verhelst A., Luta G., Sinnott R., Verstraete W., Van de Wiele T., Possemiers S. (2010a): *In vitro modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements*, «International Journal of Food Microbiology», 139, pp. 168-176.

Marzorati M., Possemiers S., Van Den Abbeele P., Van De Wiele T., Vanhoecke B., Verstraete W. (2010b): *Technology and method to study microbial growth and adhesion to host-related surfaces and the host-microbiota interactions*, WIPO Patent Application WO/2010/118857.

Mc Arthur J.V. (2006): *Microbial Ecology: An Evolutionary Approach*, Oxford Academic Press.

Parfrey L.W., Walters W.A., Knight R. (2011): *Microbial eukaryotes in the human microbiome: ecology, evolution, and future directions*, «Frontiers in Microbiology», 2, p. 153.

Possemiers S., Bolca S., Grootaert C., Heyerick A., Decroos K., Dhooge W., De Keukeleire D., Rabot S., Verstraete W., Van de Wiele T. (2006): *The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (Humulus lupulus L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine*, «Journal of Nutrition», 136, pp. 1862-1867.

Possemiers S., Grootaert C., Vermeiren J., Gross G., Marzorati M., Verstraete W., Van de Wiele T. (2009): *The intestinal environment in health and disease - recent insights on the potential of intestinal bacteria to influence human health*, «Current Pharmaceutical Design», 15, pp. 2051-2065.

Possemiers S., Verhelst A., Van den Abbeele P., Maignen L., Reeves Stuart G., Robinson L., Raas T., Pluvinage P., Schneider Y., Van de Wiele T., Marzorati M. (2012): *A dried yeast fermentate selectively modulates both the luminal and mucosal gut microbiota, enhances butyrate production and protects against inflammation, as studied in an integrated in vitro approach*, Submitted.

Roberfroid M. (2007): *Prebiotics: the concept revisited*, «Journal of Nutrition», 137, pp. 830S-837S.

Blackburn S. (2007): *Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology: A Clinical Perspective*, Elsevier Health Sciences, p. 495.

Van den Abbeele P., Van de Wiele T., Verstraete W., Possemiers S. (2011): *The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept*, «FEMS Microbiology Reviews», 35, pp. 681-704.

Van den Abbeele P., Roos S., Eeckhaut V., MacKenzie D.A., Derde M., Verstraete W., Marzorati M., Possemiers S., Vanhoecke B., Van Immerseel F., Van de Wiele T. (2012): *Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli*, «Microbial Biotechnology», 5, pp. 106-115.

Wilson M. (2005): *Microbial inhabitants of humans*, Cambridge University Press.

Finito di stampare in Firenze
presso la tipografia editrice Polistampa
nel marzo 2013