

Il lume intestinale e la sclerosi multipla

Vincenzo Busillo

U.O. Neurologia, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale Maria SS. Addolorata Eboli (SA) – ASL Salerno

Introduzione

Il nostro organismo è dotato di diverse barriere biologiche la cui funzione è quella di mantenere l'omeostasi separando l'ambiente esterno dall'ambiente interno. Una di queste è la barriera intestinale, unità funzionale organizzata in più strati, la cui funzione è quella di mantenere una normale permeabilità dell'intestino ed impedire il passaggio del contenuto luminale nel circolo sanguigno, al fine di non attivare una risposta immunitaria anomala e non indurre uno stato flogistico. Tale barriera è in grado di riconoscere i microrganismi commensali e distinguerli dai patogeni, disponendo un'adeguata risposta immunitaria ⁽¹⁾. Una funzione di barriera intestinale compromessa è una caratteristica importante di molte malattie, come la malattia infiammatoria intestinale, malattia da trapianto contro ospite e celiachia. Il sistema nervoso centrale (SNC), estremamente sensibile alle variazioni omeostatiche, è dotato del-

la barriera emato-encefalica (BEE), unità anatomico-funzionale con funzione di protezione del tessuto cerebrale dagli elementi nocivi presenti nel sangue. Le alterazioni della BEE sono una caratteristica essenziale della fisiopatologia della sclerosi multipla (SM). La disregolazione immunitaria mediata della barriera emato-encefalica consente la migrazione delle cellule infiammatorie attivate nel cervello, che a sua volta induce demielinizzazione, perdita assonale e altri danni ai tessuti ⁽²⁾. Molte molecole presenti nelle *tight junctions* delle cellule endoteliali della BEE (occludina, claudine e *zona occludens-1*) sono identiche a quelle nei tessuti intestinali ⁽³⁾.

La barriera intestinale

La barriera intestinale è un'unità funzionale organizzata in più strati (Fig. 1): una barriera superficiale fisica che ostacola l'adesione batterica impedendone la diffusione nei tessuti sottostanti, una barriera secretoria che include peptidi anti-

microbici, muco e liquido, e una barriera immunologica funzionale più profonda in grado di discriminare i microrganismi fra patogeni e commensali, inducendo una risposta immune o una tolleranza ⁽⁴⁾. L'integrità della barriera è mantenuta anche dal pH basso del succo gastrico ad azione battericida ⁽⁵⁾.

Una delle principali cause di aumento della permeabilità della barriera intestinale è l'infiammazione, ove citochine infiammatorie (interferoni, Interleuchina-17, *Tumor Necrosis Factor- α* , lo stress ossidativo calcio-dipendente) alterano le molecole presenti nelle *tight junctions* delle cellule endoteliali ed inducono una maggiore permeabilità intestinale.

Omeostasi della barriera intestinale, microbioma e neuroinfiammazione

L'interazione fra microbioma e barriera intestinale è di fondamentale importanza per l'integrità e l'omeostasi della stessa, le cui alterazioni fa-

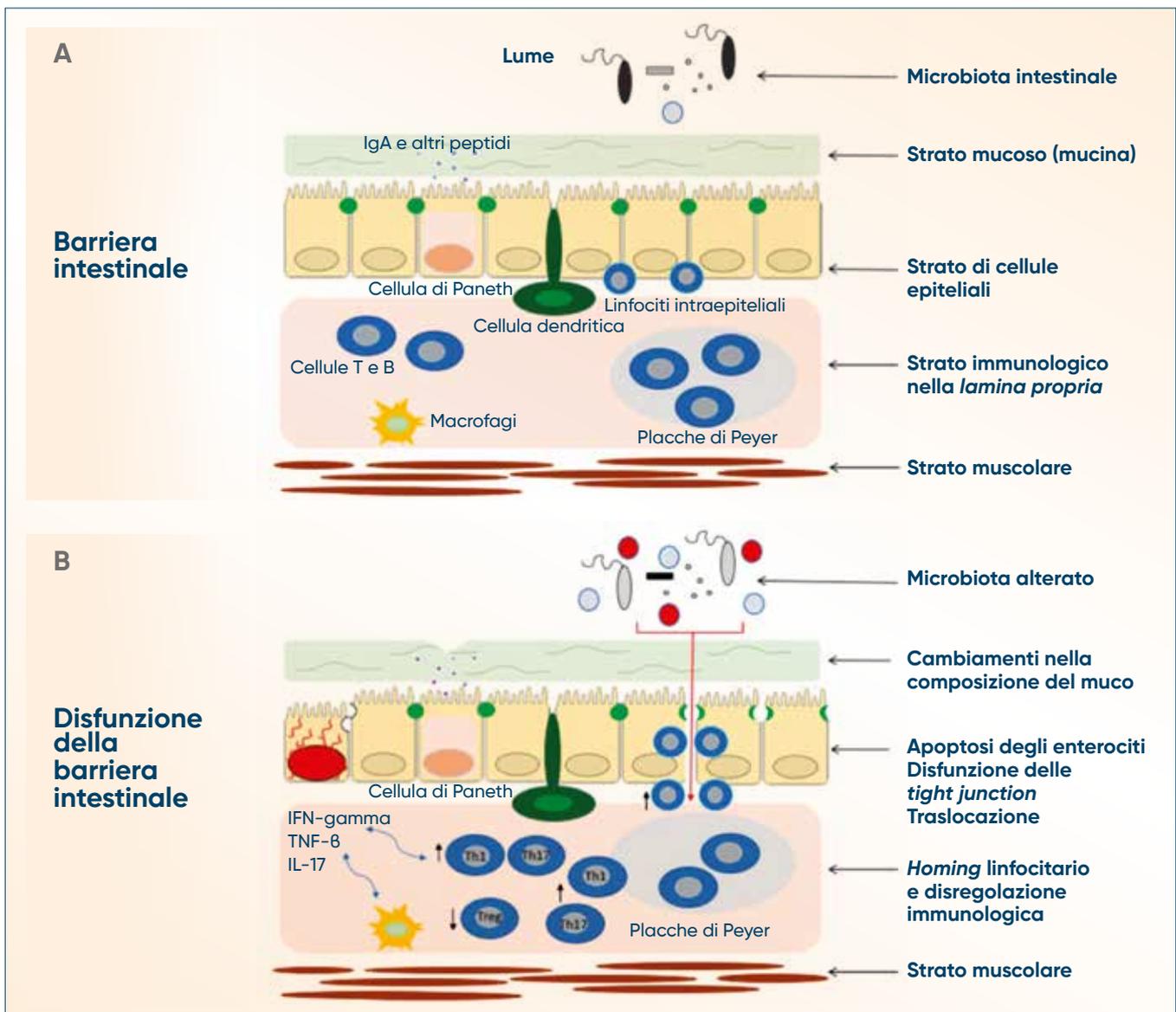


Figura 1. La normale barriera intestinale è composta da più strati (A). Dal lato luminale verso l'esterno, è presente uno strato di muco in stretto contatto con il microbiota commensale, lo strato epiteliale monocellulare (costituito da proteine a giunzione stretta qui rappresentate come cerchi verdi chiusi), la lamina propria e la sottomucosa contenente la barriera immunologica, e infine lo strato muscolare e connettivo. Cambiamenti nel microbiota, composizione del muco, morte delle cellule epiteliali, funzione delle tight junctions e disregolazione immunologica potrebbero portare alla rottura della barriera intestinale e all'aumento della permeabilità (B)⁽⁶⁾.

vorirebbero la neuroinfiammazione. A tal proposito diversi studi hanno evidenziato che nei pazienti con sclerosi multipla sono riscontrabili alterazioni nel microbioma intestinale, rafforzando il concetto di asse intestino-cervello-microbioma. A tutt'oggi sono in corso studi multicentrici volti a definire un "microbioma centrale", in quanto non è stato descritto uno specifico "fenotipo del microbioma della sclerosi multipla".

Si evidenzia un'abbondanza di *Streptococcus*, *Anaerostipes*, *Faecalibacterium*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma*, *Haemophilus*, *Blautia* e *Dorea* e una relativa riduzione di *Clostridi*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Parabacteroides* e *Adlercreutzia*. Nella sclerosi multipla pediatrica, i pazienti hanno livelli più elevati di membri di *Desulfovibrionaceae* e deplezione in *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*. Alla base dei cambiamenti del microbioma potrebbero esserci disordini

immunologici inerenti le citochine, l'interferone o le cellule pro-infiammatorie intestinali (Th17).

A tal proposito, si è visto che i topi privi di germi intestinali hanno una forma attenuata di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*).

In tali modelli sperimentali sono presenti nell'intestino e nel SNC bassi livelli di Interleuchina-17 (citochina pro-infiammatoria prodotta

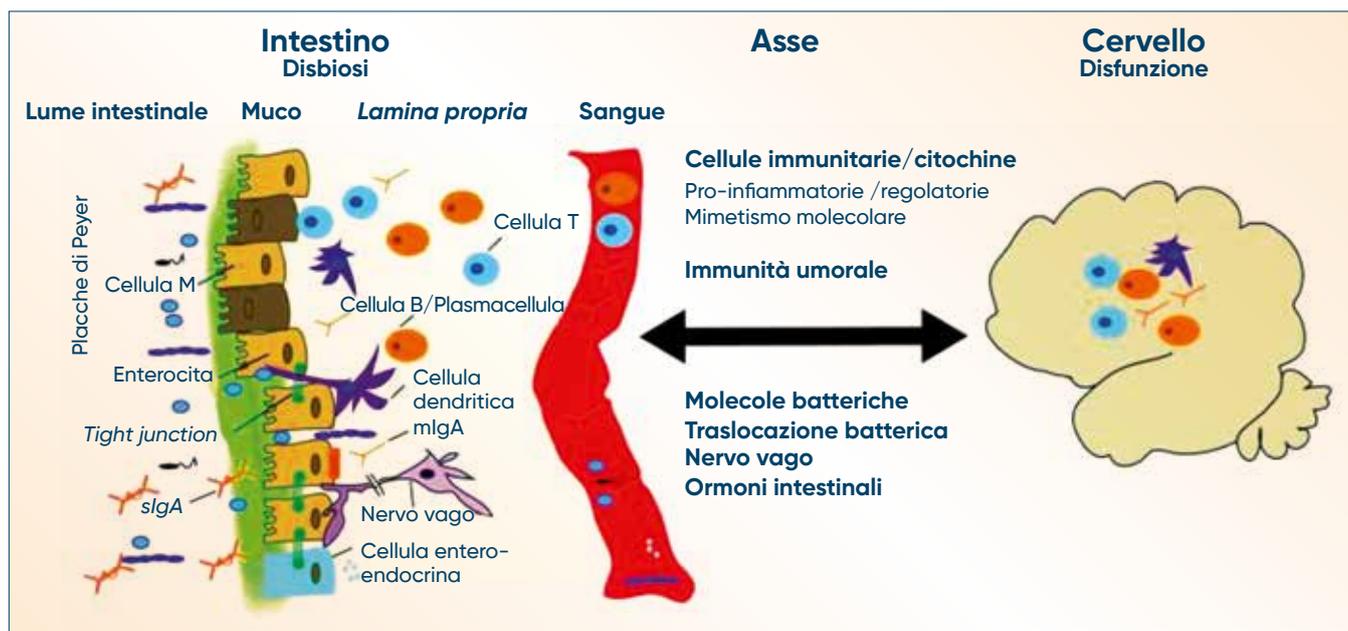


Figura 2. L'interfaccia della mucosa intestinale è una zona di intensa interazione tra il microbiota intestinale nello spazio luminale e le cellule immunitarie situate nella lamina propria e arricchita di follicoli linfoidi, le placche di Peyer. Meccanismi putativi, mediante i quali la disbiosi nell'intestino può influenzare l'infiammazione del SNC nei pazienti con SM, attraversano le cellule immunitarie tramite uno squilibrio di citochine pro- e anti-infiammatorie. Altre vie di comunicazione comprendono: l'immunità umorale, le molecole batteriche (acidi grassi, etc.), la traslocazione batterica diretta che porta all'attivazione del sistema immunitario innato, e la comunicazione diretta attraverso il nervo vago o il rilascio di ormoni intestinali (ad esempio, 5-idrossitriptamina). (*mIgA* = IgA monomerica; *slgA* = IgA secretoria).

da Th17) ed un aumento delle *Tregs* che esprimono l'ectonucleotidasi CD39 con azione immunomodulante ed anti-infiammatoria (molecola in grado di scindere l'ATP extracellulare bloccandone l'azione infiammatoria e aumentando la produzione di adenosina, cui si riconoscono proprietà anti-infiammatorie).

La colonizzazione con batteri filamentosi segmentati, che usano una struttura a gancio per attaccarsi alle cellule intestinali e rilasciare vescicole piene di molecole che possono impedire al sistema immunitario di attaccare i microbi, determina un aumento della produzione di IL-17 e lo sviluppo di EAE gravi. Al contrario, altri commensali intestinali come *P. histicola* o *B. fragilis* sono in grado di sopprimere la gravità dell'EAE, diminuendo le cellule pro-infiammatorie Th1 e Th17 e aumentando le *Tregs*.

Un microbioma alterato porta an-

che a cambiamenti in alcuni prodotti associati ai batteri noti per influenzare l'omeostasi intestinale e le risposte neuroimmuni, come gli acidi grassi a catena corta (SCFA, *Short Chain Fatty Acids*) - butirrati, propionati e acetati - prodotti dalla fermentazione anaerobica batterica di carboidrati alimentari e fibre alimentari.

Gli SCFA regolano il trasporto di sodio a livello delle cellule epiteliali intestinali e attivano l'inibizione dell'istone deacetilasi, deputata all'apoptosi cellulare oltre che regolare la struttura e la funzione immunitaria della microglia e degli astrociti; riducono anche la proliferazione delle cellule T e la produzione di citochine nell'intestino e attivano, insieme ai metaboliti del triptofano dietetico, indoxil-3-solfato e acido indolo-3-propionico, il recettore dell'aril-idrocarburo (AHR) che agiscono sull'astrocita e riducono l'infiammazione tramite gli interfe-

roni di tipo I.

A tale riguardo, si è osservato che nei pazienti SM, i livelli circolanti di agonisti AHR erano diminuiti. Nei modelli EAE, la somministrazione di SCFA ha portato ad un miglioramento della gravità della malattia in associazione con una riduzione delle cellule Th1 e un aumento delle *Tregs* ⁽⁷⁾.

Gli SCFA potrebbero anche modulare la permeabilità della barriera emato-encefalica agendo a livello delle molecole presenti nelle *tight junctions* delle cellule endoteliali (occludina) ⁽⁸⁾ (Fig. 2).

Un elemento immunopatogeno comune fra SM e microbiota intestinale potrebbe essere legato a meccanismi di mimetismo molecolare, ove linfociti autoreattivi specifici potrebbero essere attivati in modo incrociato da antigeni presenti in microrganismi del microbiota, come *Bacteroides* spp ed *Enterococcus faecalis* e la mielina ⁽⁹⁾.

Alterazione della barriera intestinale e malattie demielinizzanti

Diverse malattie gastrointestinali, caratterizzate da alterazioni della barriera intestinale, sono frequentemente in comorbidità con malattie demielinizzanti. In particolare, la malattia infiammatoria cronica intestinale (IBD, *Inflammatory Bowel Disease*) condivide con la sclerosi multipla comuni aspetti epidemiologici, genetici ed immunologici e, più specificamente, una maggiore incidenza di IBD tra i pazienti con SM e di SM tra i pazienti con IBD. Sia i pazienti con IBD che quelli con SM sembrano avere un rischio aumentato del 50% di comorbidità con SM o IBD, rispettivamente, senza alcuna differenza tra la malattia di Crohn e la colite ulcerosa. Nei pazienti con IBD è presente un aumen-

to di 3 volte delle lesioni iperintense della sostanza bianca alla risonanza magnetica, una riduzione del volume della sostanza grigia e una ridotta diffusività assiale nei principali tratti della sostanza bianca.

Le lesioni della sostanza bianca nella IBD possono essere di varia natura (ischemica, vasculitica), ma è indicativo il riscontro di demielinizzazione in oltre il 70%, rispetto al 30% nei controlli per età e per sesso.

Tali elementi potrebbero evidenziare un collegamento fra la barriera intestinale e la demielinizzazione del SNC, non solo in rapporto con il microbioma intestinale commensale ma anche con l'integrità della barriera stessa.

È stato osservato che il test di permeabilità al lattulosio/mannitolo è anormale in una larga percentuale dei pazienti SM, pur non rilevando

alcuna associazione tra alterazioni della permeabilità e carico della lesione alla RM cerebrale⁽¹⁰⁾. Analoghi riscontri sono stati evidenziati anche nei modelli sperimentali di EAE (modelli animali di sclerosi multipla) ove si è osservata alterata permeabilità intestinale, ridotto spessore della sottomucosa e alterazioni delle *tight junctions* nelle cellule epiteliali intestinali in rapporto alla gravità dell'EAE.

Le alterazioni della barriera intestinale possono essere in rapporto ad infezioni sistemiche o del SNC, complicanza comune nei pazienti con SM, ad anomalie dell'interazione microbiota-barriera, da cui una variazione impropria della risposta immunitaria con disregolazione neuroimmune per passaggio anormale trans mucoso di antigeni dannosi o immunogenici (Fig. 3).

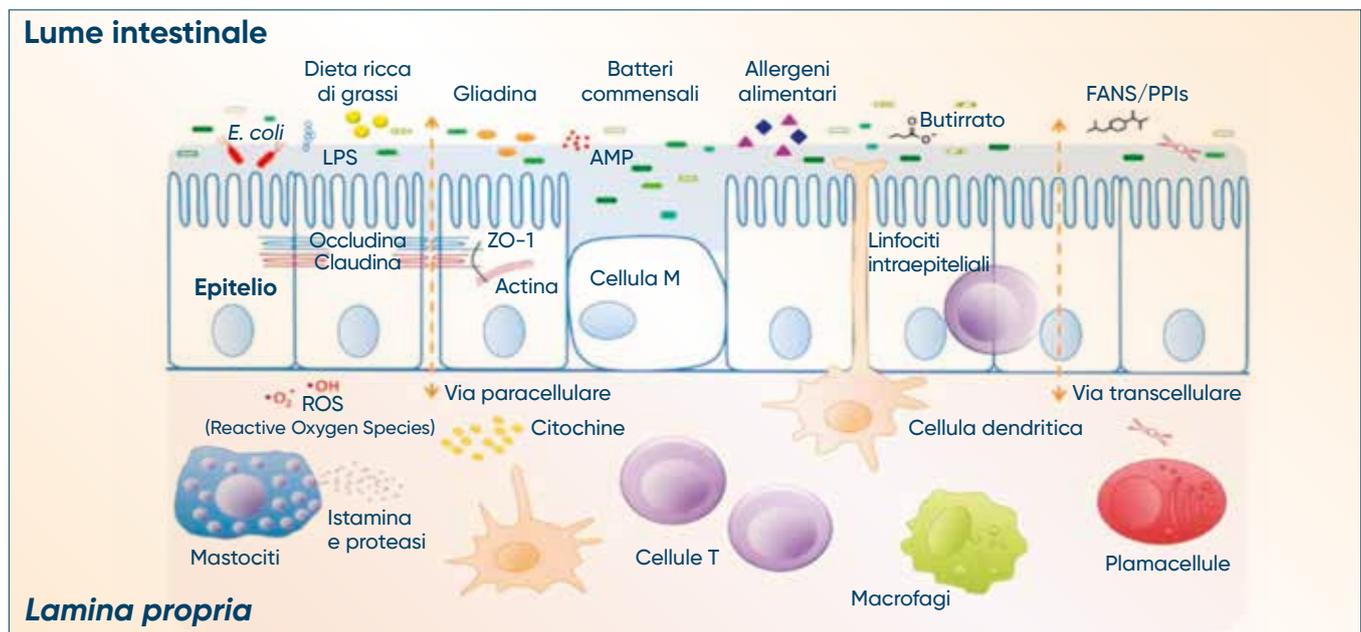


Figura 3. La barriera intestinale è composta da diversi strati che forniscono protezione contro l'invasione microbica. Il lume intestinale contiene peptidi antimicrobici (AMP), IgA e batteri commensali che inibiscono la colonizzazione di agenti patogeni. Uno strato di muco copre la superficie intestinale fornendo una barriera fisica. Lo strato epiteliale è costituito da un singolo strato di cellule epiteliali che sono sigillate da proteine a giunzione stretta come occludina, claudina e zonulina-1 che impediscono il passaggio paracellulare. Questo strato ospita anche linfociti intraepiteliali, cellule M (placche di Peyer sovrastanti e follicoli linfoidi), cellule di calice che producono muco e cellule di Paneth che producono batteriocina. La lamina propria contiene una grande quantità di cellule immunitarie, sia del sistema immunitario innato (ad es. macrofagi, cellule dendritiche, mastociti) sia del sistema immunitario adattativo (ad es. cellule T, plasmacellule che producono IgA). Inoltre, le cellule del SNC ed enterico innervano nella lamina propria. I fattori che influenzano la funzione di barriera intestinale includono batteri patogeni come l'*E. coli* enteropatogeno, una dieta ricca di grassi, lipopolisaccaridi (LPS), farmaci come i FANS e gli inibitori della pompa protonica (PPI), nonché vari allergeni alimentari e la componente gliadina del glutine⁽¹⁰⁾.

Le alterazioni dei meccanismi omeostatici intestinali nella SM potrebbero avere, come conseguenza, un aumento della traslocazione batterica attraverso una barriera intestinale compromessa.

Si è osservata una correlazione fra livelli plasmatici di endotossina (lipopolisaccaride, LPS) con produzione di IL-6, citochina multifunzionale, sia pro-infiammatoria, sia anti-infiammatoria, e scala EDSS da cui l'ipotesi di un'endotossinemia di basso grado che potrebbe essere presente in pazienti con SM, probabilmente a causa della traslocazione batterica nel contesto di una barriera intestinale alterata. Infine, anche l'uso

di terapie orali modificanti la malattia e/o di farmaci sintomatici nella sclerosi multipla costituisce una preoccupazione, poiché la barriera intestinale è essenziale per l'assorbimento dei farmaci.

Farmaci modificanti il decorso della malattia e barriera intestinale

I farmaci modificanti il decorso di malattia (DMDs, *Disease-Modifying Drugs*) normalmente utilizzati nella SM possono modificare il microbioma, ma non è noto con esattezza se i loro possibili effetti sulla barriera intestinale possono contribuire all'efficacia terapeutica (Fig. 4).

Interferoni

Esistono prove che suggeriscono che gli interferoni endogeni potrebbero influenzare la barriera intestinale. Gli interferoni di tipo I, inclusi IFN α e IFN β , sono parte integrante della risposta immunitaria dell'ospite innato al microbiota intestinale e modulano le interazioni bilaterali tra cellule epiteliali e flora commensale.

Agirebbero stabilizzando le barriere biologiche (barriera intestinale, BEE) agendo sulle *tight junctions* delle cellule endoteliali, inibendo la continua proliferazione dell'epitelio intestinale e aumentando la quota di *Tregs* intestinali.

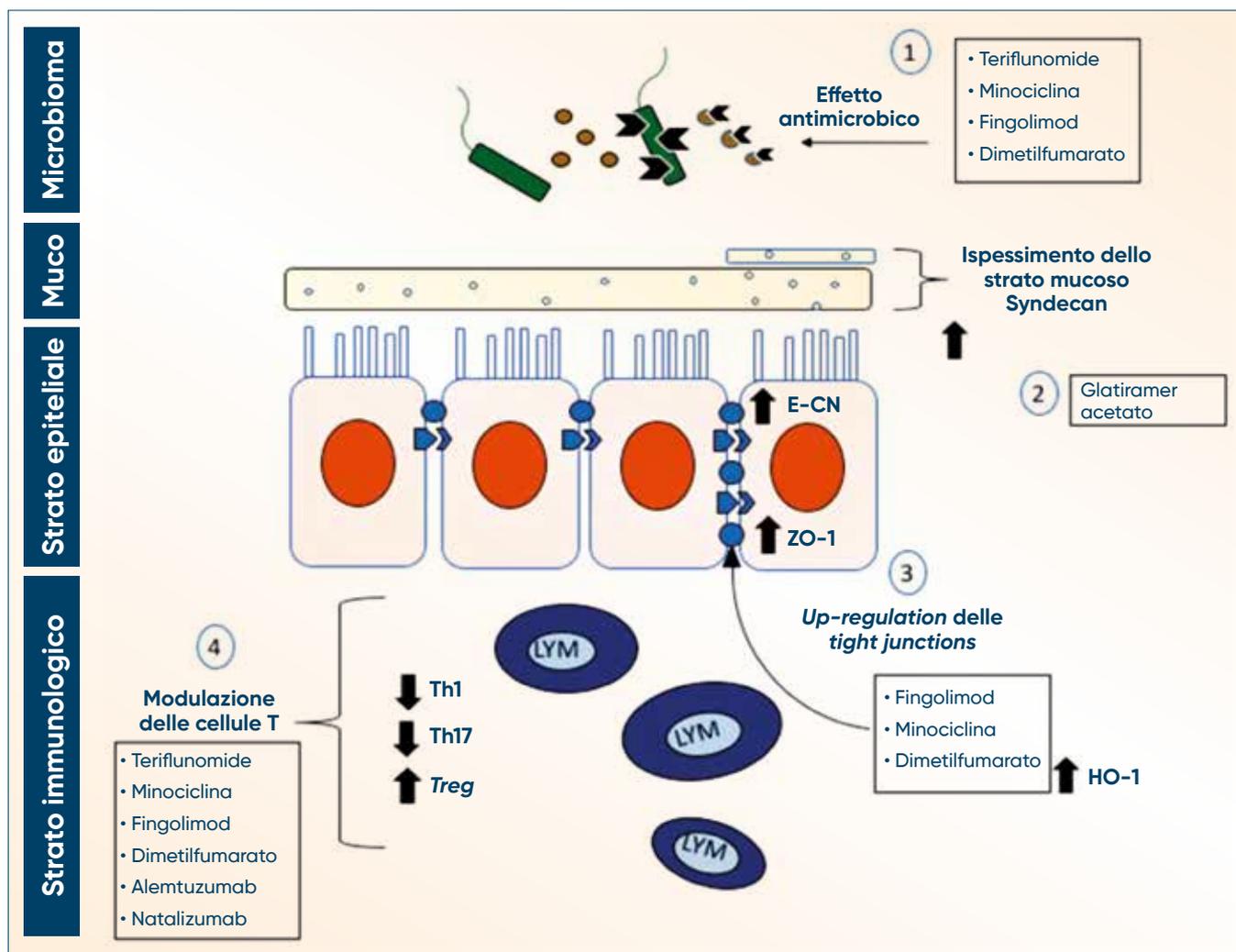


Figura 4. Diversi DMDs nell'uso clinico possono modulare vantaggiosamente la funzione di barriera intestinale attraverso una varietà di meccanismi.

Altresì, il microbiota intestinale stimola la produzione di IFN β a livello dendritico.

Glatiramer acetato

Diversi studi hanno dimostrato che il glatiramer acetato (GA) riduce la lesione del colon nei modelli animali di colite, attraverso la riduzione della segnalazione del TNF α , l'elevazione delle cellule T regolatorie e l'aumento dei mediatori anti-infiammatori come IL-10 e TGF β .

Il GA induce anche una modificazione del microbiota con variazioni quantitative di *Bacteroidaceae*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillaceae*, *Clostridium* e altri *Clostridiales*.

Natalizumab

Il natalizumab blocca le integrine, glicoproteine implicate nel processo immuno-infiammatorio nelle IBD per la loro azione di reclutamento dei linfociti T nel sito della flogosi, potendo modulare la risposta infiammatoria in questa zona nella sclerosi multipla.

Nei modelli di EAE di topo si osserva un aumento di cellule pro-infiammatorie Th17 e una riduzione di *Tregs* nell'intestino. Le integrine promuovono la differenziazione delle cellule Th17. Nei pazienti con sclerosi multipla, il trattamento con natalizumab riduce le popolazioni di integrina α -4-positivi Th1, Th17 e *Tregs* in modo differenziato ipotizzando l'intestino quale serbatoio e sito di attivazione per Th17 ed altre cellule T.

È possibile che le proprietà terapeutiche di natalizumab nella sclerosi multipla possano dipendere, almeno in parte, da questi effetti intestinali sulle integrine e sulla circolazione di linfociti, oltre a quelli

osservati nella barriera emato-encefalica. L'intestino potrebbe fungere da punto di controllo, un serbatoio e un sito di attivazione per Th17 e altre cellule T, un processo regolato in parte dalle integrine intestinali.

Natalizumab e il suo blocco non selettivo dell'integrina potrebbero portare a cambiamenti nel modo in cui i linfociti interagiscono con il tessuto intestinale.

Fingolimod

Un altro farmaco che agisce attraverso la regolazione del traffico di leucociti è il fingolimod, un antagonista funzionale del recettore 1-fosfato di sfingosina (S1P). I recettori S1P1 sono altamente espressi sulle membrane dei linfociti e sono fondamentali per l'uscita delle cellule T e B dagli organi linfoidi secondari. S1P può influenzare la barriera intestinale modulando le proteine delle *tight junctions* delle cellule endoteliali, in particolare in condizioni infiammatorie.

Fingolimod può anche influenzare direttamente il microbiota. Sia la sfingosina, sia il fingolimod inibiscono la crescita di *C. perfringens* e la produzione di endotossina *in vitro*, suggerendo una proprietà antibatterica intrinseca.

Dimetilfumarato

Il dimetilfumarato (DMF) è derivato dal semplice acido fumarico e agisce come immunomodulatore promuovendo l'apoptosi delle cellule T, passando a una risposta Th2 e agendo da antiossidante.

Esistono prove limitate ma interessanti che suggeriscono come DMF potrebbe influire positivamente sia sulla barriera intestinale, sia sul microbiota intestinale.

Il dimetilfumarato allevia la colite

indotta sperimentalmente, riducendo la risposta Th1 nei modelli murini e proteggendo le cellule epiteliali intestinali umane dalle alterazioni della barriera ossidativa, preservando la *zona occludens-1* e l'espressione dell'occludina *in vitro*.

Preserva anche la morfologia della mucosa intestinale dopo l'esposizione alle micotossine, diminuisce la permeabilità intestinale rafforzando le *tight junctions* e presenta proprietà antimuffa e antibatteriche. Infine, il DMF ha anche portato ad una maggiore diversità del microbioma, con una maggiore abbondanza di batteri che producono SCFA.

Alemtuzumab

Alemtuzumab è un anticorpo anti-CD52 che provoca una contrazione rilevante dei linfociti. Nonostante il suo meccanismo d'azione specifico, ci sono prove che suggeriscono che ha effetti dannosi sull'integrità della barriera intestinale, aumentandone la permeabilità per alterazioni ultrastrutturali delle *tight junctions* e potrebbe alterare il microbioma intestinale.

Teriflunomide

La teriflunomide inibisce in modo selettivo e reversibile la diidroorotato deidrogenasi, determinando una riduzione del numero di linfociti attivati che entrano nel sistema nervoso centrale.

Tale sostanza potrebbe alterare il microbioma e la risposta dell'ospite ai patogeni enterali. Il trattamento delle cellule epiteliali intestinali suine con teriflunomide ha portato a una ridotta capacità di combattere le infezioni batteriche attraverso la soppressione della segnalazione STAT-6⁽¹²⁾.

Eventuali terapie per le alterazioni della barriera intestinale

Esistono poche strategie terapeutiche per le alterazioni della barriera intestinale e sono indirizzate verso diversi elementi della stessa:

- **tight junctions delle cellule endoteliali**
acetato di larazotide, octapeptide sintetico sviluppato per la celiachia in grado di ridurre la permeabilità intestinale agendo sulla zonulina e actina ⁽¹³⁾;
- **arricchimento dello strato di muco intestinale**
lecitine, in particolare fosfati-

dilcolina ⁽¹⁴⁾, cellule staminali (terapie in studio per la IBD);

- **omeostasi immunitaria**
Vit. D: protezione della permeabilità intestinale, riduzione di apoptosi cellulare, azione sulle *tight junctions*;
- **probiotici**
stabilizzazione della barriera, trapianto di microbiota fecale, modulazione della risposta immunitaria nel modello EAE di topo;
- **acidi grassi a catena corta (SCFA)**
protezione delle *tight junctions*, azione sulla mucina con miglioramento mucoprotettivo sulle cellule epiteliali intestinali.

Conclusioni

La barriera intestinale è la zona fisica e funzionale di interazione tra il microbioma luminale e l'organismo ed è anche responsabile della modulazione di molteplici processi biochimici e della modulazione immunitaria della mucosa.

Tutto ciò influenza in maniera diretta la microglia e la neuroinfiammazione.

Senza alcun dubbio, studi futuri dovranno prendere in considerazione il microbioma, la barriera intestinale e i cambiamenti neuroimmunologici a valle, per adattarli a loro in un unico modello integrativo ■

Bibliografia

1. Scaldaferri F, Pizzoferrato M, Gerardi V, et al. The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46 Suppl:S12-7.
2. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MA, et al. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res.* 2014;45(8):687-97.
3. Kamphuis WW, Derada Troletti C, Reijerkerk A, et al. The blood-brain barrier in multiple sclerosis: microRNAs as key regulators. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2015;14(2):157-67.
4. Reinhold AK, Rittner HL. Barrier function in the peripheral and central nervous system—a review. *Pflugers Arch.* 2017;469(1):123-34.
5. Lopetuso LR, Petito V, Zambrano D, et al. Gut Microbiota: A Key Modulator of Intestinal Healing in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis.* 2016;34(3):202-9.
6. Camara-Lemarroy CR, Metz L, Meddings JB, et al. The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain.* 2018;141(7):1900-16.
7. Mizuno M, Noto D, Kaga N, et al. The dual role of short fatty acid chains in the pathogenesis of autoimmune disease models. *PLoS One.* 2017;12(2):e0173032.
8. Wan Saudi WS, Sjöblom M. Short-chain fatty acids augment rat duodenal mucosal barrier function. *Exp Physiol.* 2017;102(7):791-803.
9. Westall FC. Molecular mimicry revisited: gut bacteria and multiple sclerosis. *Clin Microbiol.* 2006;44(6):2099-104.
10. Buscarinu MC, Cerasoli B, Annibali V, et al. Altered intestinal permeability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a pilot study. *Mult Scler.* 2017;23(3):442-6.
11. König J, Wells J, Cani PD, et al. Human intestinal barrier function in health and disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 2016;7(10):e196.
12. Yi H, Jiang D, Zhang L, et al. Developmental expression of STATs, nuclear factor-κB and inflammatory genes in the jejunum of piglets during weaning. *Int Immunopharmacol.* 2016;36:199-204.
13. Leffler DA, Kelly CP, Abdallah HZ, et al. A randomized, double-blind study of larazotide acetate to prevent the activation of celiac disease during gluten challenge. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(10):1554-62.
14. Stange EF. Improvement of a 'Leaky' intestinal barrier. *Dig Dis.* 2017;35(1-2):21-4.