



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Psicologia Generale

Corso di laurea magistrale in Psicologia Clinica

Tesi di laurea magistrale

**L'asse microbiota-intestino-cervello: il ruolo di questa
interazione nei disturbi psichiatrici, neurodegenerativi e del
neurosviluppo**

*The microbiota-gut-brain axis: the role of this interaction in psychiatric,
neurodegenerative, and neurodevelopmental disorders*

Relatore:
Prof. Alessandro Angrilli

Laureanda: **Miriana Marasco**
Matricola: 1206469

Anno accademico 2021/2022

Indice

Introduzione	4
Capitolo 1 I microbi intestinali e il cervello: un cambio di prospettiva	6
1.1 Cos'è il microbiota	7
1.2 Il ruolo del microbiota nella condizione di salute.....	8
1.3 La comunicazione tra intestino e cervello	10
1.3.1 Le modalità di segnalazione efferente: la trasmissione dal SNC all'intestino e l'influenza sul microbioma intestinale.....	12
1.3.2 Le modalità di segnalazione afferente: la segnalazione dall'intestino al SNC e l'influenza operata dal microbioma intestinale.....	15
1.4 La sottile linea tra disagio organico e psicologico.....	17
1.5 Il ruolo dello stress nella dinamica cerebro-intestinale	19
Capitolo 2 Come cambia il microbiota nel corso della vita: la relazione con il neurosviluppo.....	24
2.1 Il periodo prenatale	24
2.2 Il periodo postnatale	26
2.3 L'infanzia e l'adolescenza	28
2.4 L'età adulta e l'invecchiamento.....	28
Capitolo 3 Lo studio dell'asse microbiota-intestino-cervello	30
3.1 Gli animali privi di germi	31
3.2 Gli antibiotici	34
3.3 Il trapianto di microbiota fecale.....	34
3.4 L'infezione indotta.....	36
3.5 Probiotici e prebiotici	36

Capitolo 4 I fattori ambientali coinvolti nella dinamica cerebro-intestinale.....	39
4.1 L'alimentazione e l'alcol	40
4.2 L'esposizione alle sostanze chimiche e ai farmaci	44
4.3 L'esercizio fisico	45
4.4 I ritmi circadiani	47
4.4.1 I disturbi psichiatrici e neurodegenerativi tra ritmo circadiano e microbiota	49
Capitolo 5 Il coinvolgimento dell'asse nei disturbi del SNC	51
5.1 I disturbi dello spettro autistico	51
5.1.1 Evidenze cliniche a sostegno di una terapia basata sul microbiota	58
5.3 I disturbi neurodegenerativi	60
5.3.1 La malattia di Parkinson	62
5.3.2 La malattia di Alzheimer	66
5.3.3 Evidenze cliniche a sostegno di un intervento basato sul microbiota.....	70
5.4 Stress, ansia e depressione.....	71
5.4.1 Evidenze cliniche a sostegno di una terapia basata sul microbiota	76
Conclusione	79
Bibliografia.....	84

Introduzione

La scoperta e l'esplosivo progresso nella caratterizzazione del microbioma intestinale hanno aggiunto un'ulteriore componente a lungo trascurata alla complessa segnalazione bidirezionale tra cervello e intestino. Lo scetticismo iniziale nei confronti delle evidenze che hanno suggerito un ruolo cruciale della flora batterica intestinale nel plasmare la neurochimica cerebrale e il comportamento ha lasciato il posto a un cambiamento di paradigma senza precedenti, che si è tradotto in una nuova concettualizzazione della salute fisica e mentale. L'entusiasmo che ne è inevitabilmente derivato ha indotto la comunità scientifica a rivolgere l'attenzione verso la condizione patologica, con particolare riguardo alle malattie neurologiche e psichiatriche.

La comprensione della patogenesi di molti disturbi è attualmente ancora alle sue fasi iniziali, così come anche le proposte di trattamento ad oggi a disposizione non garantiscono sempre una remissione o un'attenuazione soddisfacente dei sintomi. A tutto ciò consegue naturalmente un'urgenza di approfondimento dettata anche dall'evidente incremento del tasso di prevalenza di condizioni come i disturbi depressivi e d'ansia, dei disturbi dello spettro autistico e neurodegenerativi.

Nel corso del capitolo 1 verrà fornita una panoramica del funzionamento della dinamica cerebro-intestinale, con particolare riguardo all'inserimento del microbiota nella comunicazione bidirezionale e alle conseguenti implicazioni nella salute fisica e psicologica. In considerazione della centralità dello stress come fattore influente, il suo impatto verrà sviscerato in diverse occasioni nel corso dell'elaborato. Nel capitolo 2 verrà dato spazio alle variazioni della composizione del microbiota nel corso della vita, ponendo luce sul percorso parallelo del neurosviluppo e sulle possibili variabili interferenti che si impongono come fattori di rischio per l'insorgenza di condizioni patologiche. Successivamente si vedrà una breve trattazione dei metodi di studio utilizzati in questo ambito e si forniranno alcuni esempi ad indicazione dell'utilità apportata. A seguire verrà dato rilievo ai fattori ambientali che, interagendo con il microbiota intestinale, si configurano come elementi degni di considerazione ai fini di una

comprensione completa del suo ruolo nella nostra vita. Per ultimo, nel capitolo 5 verrà proposta una reinterpretazione dei disturbi dello spettro autistico, delle malattie di Parkinson e di Alzheimer e dei disturbi stress-relati. Verrà approfondito come la scoperta del microbiota intestinale ha determinato dei cambiamenti nelle conoscenze relative all'eziologia e alla patofisiologia di queste condizioni, così come ha fornito, in alcuni casi, evidenze di nuove tipologie di trattamento. Si vedrà infatti che la terapia basata sulla modulazione della flora batterica ha ottenuto numerosi riscontri positivi nell'ambito terapeutico, con la conseguente diffusione di un forte entusiasmo, al punto che spesso si fa riferimento ad una vera e propria rivoluzione psicobiotica.

Capitolo 1

I microbi intestinali e il cervello: un cambio di prospettiva

Una letteratura sempre più corposa sostiene una segnalazione bidirezionale tra il cervello e l'intestino che si propaga lungo vie ormonali, neurali e immunologiche. Il legame tra intestino e cervello non solo garantisce il mantenimento dell'omeostasi gastrointestinale e della digestione, ma è probabilmente coinvolta nella modulazione di emozioni, motivazione e funzioni cognitive superiori, come per esempio il processo decisionale intuitivo. Inoltre, è ormai sempre più riconosciuto che la disfunzione dell'asse intestino-cervello può avere delle conseguenze fisiopatologiche. Infatti, le alterazioni nell'interazione intestino-cervello sono associate a infiammazioni intestinali, sindrome del dolore addominale cronico e disturbi alimentari (Mayer, 2011). Per di più, la modulazione della funzione dell'asse intestino-cervello è associata ad alterazioni nella risposta allo stress e nel comportamento. L'elevata comorbilità tra i sintomi psichiatrici legati allo stress come l'ansia e i disturbi gastrointestinali (tra cui la sindrome dell'intestino irritabile (SII) e il disturbo infiammatorio intestinale) è un'ulteriore prova dell'importanza di questo asse nella fisiopatologia (Cryan & Dinan, 2012).

Le scoperte relative al legame di interazione tra intestino e cervello hanno inevitabilmente allargato la visione del funzionamento del nostro sistema corporeo, ma ancora più rivoluzionaria è stata la scoperta, avvenuta nel corso degli ultimi decenni, di un nuovo attore che riveste il ruolo di regolatore chiave dell'asse intestino-cervello, il microbiota. L'individuazione della dimensione e della complessità hanno portato alla rivalutazione di molti concetti di salute e malattia, compresi i disturbi che coinvolgono il Sistema Nervoso Centrale (SNC).

1.1 Cos'è il microbiota

Il microbiota umano è il termine collettivo per i microrganismi che vivono all'interno e sulla superficie del nostro corpo. Per diversi anni si è sostenuto che il rapporto tra cellule microbiche e cellule umane era di 10:1, con un numero di microbi stimato pari a 100 trilioni. Ad oggi, grazie agli studi di Sender et al. (2016), sappiamo che il rapporto è di 1,3:1, dato che dimostra una discrepanza numerica decisamente più ridotta. Nonostante il ridimensionamento del rapporto però, il numero di microbi rimane senza dubbio considerevole, soprattutto se lo si considera a livello genetico: il 99% dei nostri geni è di natura microbica, raggiungendo un numero di 10 milioni. Inoltre, un fattore da tenere in considerazione è la natura del microbiota: dinamica, diversificata e reattiva agli input esterni, caratteristiche che non appartengono invece al genoma umano (Cryan et al., 2019). Il numero stimato di specie nel microbiota intestinale varia notevolmente, ma se si considerano gli attuali dati dello Human Microbiome Project Consortium (2012), si evince una stima di almeno 2776 specie procariotiche individuate tramite isolamento dalla materia fecale umana. È generalmente accettata la preponderanza di quattro filotipi batterici, che costituiscono il 98% del microbiota. *Firmicutes* (64%) e *Bacteroides* (23%) sono i più diffusi, seguiti in decrescenza da *Proteobacteria* (8%) e *Actinobacteria* (3%) (Cryan et al., 2019; Anderson et al., 2017). Nonostante le sfide poste dall'elevata variabilità interindividuale, alcuni hanno tentato di individuare una classificazione delle colonie di microbiota intestinale umano in diversi enterotipi. Sebbene si tratti senza dubbio di un sistema di classificazione controverso e semplicistico, sono stati proposti tre enterotipi, a seconda della preponderanza specifica di *Bacteroides*, *Prevotella* o *Ruminococco*. Dato curioso è la rilevanza funzionale, data dalla predisposizione indotta dall'enterotipo verso una determinata tipologia di dieta: mentre i *Bacteroides* sono associati a una dieta ad alto contenuto di grassi o di proteine, mentre i *Prevotella* si associano a una dieta ricca di carboidrati (Cryan et al., 2019).

Oggi il microbioma gode senza dubbio di una considerazione notevole, ma non è sempre stato così. Tradizionalmente, i microrganismi non erano considerati particolarmente rilevanti per lo sviluppo e il funzionamento del SNC o nella fisiopatologia di malattie di origine cerebrale. Tra i vari studi che hanno determinato un cambio di prospettiva e che hanno fatto sì che il microbioma diventasse il cuore

dell'attuale ricerca in merito alla comunicazione intestino-cervello è da citare quello di Berdoy et al. (2000), incentrato sul programma di sopravvivenza di un microrganismo, il *Toxoplasmosi gondii*. Tale parassita sopravvive e si riproduce in modo straordinariamente ingegnoso ed egocentrico: sebbene possa riprodursi esclusivamente nel tratto gastrointestinale dei gatti, ha la capacità di infiltrarsi nel cervello di qualunque mammifero (incluso l'uomo), superando agilmente la barriera emato-encefalica (BEE). Una volta che l'infezione è in atto, il gatto espelle il parassita attraverso le feci, le quali vengono successivamente ingerite dai roditori. A questo punto, il toxoplasma produce delle cisti in tutto il corpo del roditore e, in particolare, nel cervello. Ciò che permette la riproduzione del parassita sono i cambiamenti, soprattutto di carattere comportamentale, indotti dal suo attacco: il topo infetto non solo non evita come d'abitudine il gatto, ma anzi ne ricerca l'odore emanato dall'urina. Il bersaglio del parassita è il sistema operativo emozionale del roditore, zona cerebrale dedicata alla produzione del timore. In aggiunta, le cisti causate dall'infezione a livello cerebrale generano anche un'attrazione sessuale nei confronti del gatto, che si manifesta quando i topi ne percepiscono l'odore.

Esistono molti altri microbi che hanno sviluppato modi incredibilmente sofisticati per manipolare il comportamento dell'animale ospite, come per esempio il virus della rabbia. Esso penetra in uno specifico circuito cerebrale preposto alla collera e all'aggressività: aumentando la probabilità che l'animale infetto attacchi un suo simile, viene a sua volta incrementata la possibile trasmissione del virus (Mayer, 2016).

Parassiti e virus non sono però gli unici microrganismi dotati del potenziale di modificare il nostro comportamento: come già accennato, negli ultimi decenni la ricerca si sta concentrando sul microbiota e sul suo impatto nella comunicazione bidirezionale tra intestino e cervello. La sua influenza si rintraccia in molteplici condizioni di salute, dall'equilibrio omeostatico allo stato di disbiosi, con espressioni di natura fisiologica e psicologica.

1.2 Il ruolo del microbiota nella condizione di salute

La comunità batterica che popola l'intestino è per la gran parte non solo innocua, ma anche benefica per la nostra salute e il nostro benessere; generalmente, gli scienziati si riferiscono a questi batteri definendoli simbiotici o commensali. La funzione dei simbiotici

è quella di proteggere l'intestino e di garantire una condizione di equilibrio; inoltre, essi forniscono vitamine essenziali, metabolizzano i composti digestivi – gli acidi biliari secreti dal fegato – e attenuano la nocività degli xenobiotici, ovvero quelle sostanze chimiche estranee al nostro corpo. La funzione più rilevante è quella di supportare l'apparato digerente nel processo digestivo, fornendoci le fibre alimentari e le molecole di zuccheri complessi che, in assenza dei simbiotici, non verrebbero scomposte e assorbite (Mayer, 2016; Mohajeri et al., 2018). All'interno dell'intestino i microbi beneficiano di nutrimento, temperature adatte alla loro sopravvivenza e l'accesso alla circolazione vigente tra intestino e cervello e alle relative informazioni trasmesse. Dai segnali captati all'interno del flusso di comunicazione, i microbi captano dati inerenti ai nostri stati emotivi e il livello di stress. In funzione dei rapporti attuati, viene effettuata una continua e sottile regolazione dei metaboliti prodotti, al fine di preservare lo stato di equilibrio intestinale e garantire nel complesso condizioni di vita ottimali (Mayer, 2016).

In un individuo in salute sussiste un patto reciprocamente vantaggioso tra ospite e microbiota, in cui quest'ultimo rimane relativamente stabile. Più in dettaglio, fattori quali la predominanza di batteri simbiotici rispetto ai patobionti – batteri potenzialmente patogeni -, una sana immunità innata che controlla la crescita di questi ultimi, una barriera intestinale intatta e una buona funzione intestinale, supportano la relazione simbiotica vigente all'interno dell'asse che collega il SNC e il microbiota intestinale (Borre et al., 2014a). È generalmente accettato, infatti, che un microbiota intestinale stabile è essenziale per una normale fisiologia intestinale e determina il corretto funzionamento dell'asse intestino-cervello nonché, più in generale, uno stato di salute ottimale (Cryan & Dinan, 2012). Nell'ambiente intestinale però, risiede anche un numero ridotto di batteri potenzialmente pericolosi per l'organismo, i sopraccitati patobionti. Sebbene siano solitamente silenti, tali microrganismi possono rivolgere il loro attacco alle pareti intestinali, causando infiammazioni o ulcere. Ciò può avvenire generalmente quando si assumono antibiotici, si vive una condizione di forte stress, o si introducono cambiamenti nella propria dieta alimentare. La conseguenza dell'attacco dei patobionti è un eccessivo accumulo o una maggiore carica virulenta di determinate popolazioni batteriche, che determinano la trasformazione dei simbiotici in patobionti, con conseguente disbiosi (Mayer, 2016). La condizione di disbiosi implica la perturbazione della delicata relazione sinergica ospite-microbiota. Tale stato determina non solo una funzionalità intestinale

anormale e una compromissione della comunicazione vigente tra intestino e cervello, ma soprattutto induce potenzialmente a malfunzionamenti a livello del SNC con possibili conseguenti stati patologici a livello neurochimico, cognitivo, comportamentale, di risposta allo stress e dolorifico (Figura 1; Borre et al., 2014a).

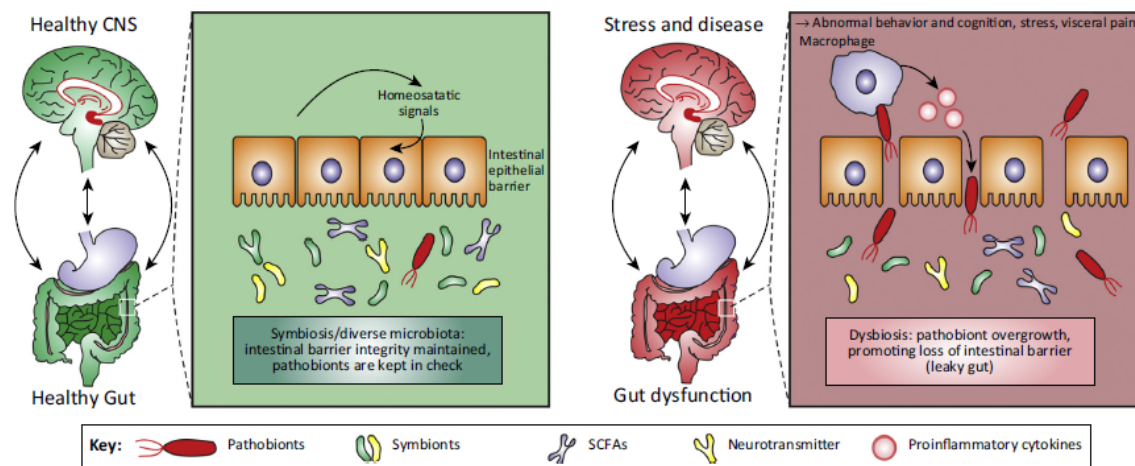


Figura 1: L'asse microbiota-intestino cervello nelle condizioni di equilibrio e di stress. A sinistra è illustrata la condizione di simbiosi: intestino e cervello sono in salute, i patobionti sono sotto controllo e la barriera gastro-intestinale è integra; a destra vi è la disbiosi: cervello e intestino risentono di disfunzioni che si traducono in comportamento anomalo, stress, dolore intestinale, barriera intestinale compromessa e crescita fuori controllo dei batteri patogeni. Abbreviazioni: SCFA,s, acidi grassi a catena corta (Borre et al., 2014a).

1.3 La comunicazione tra intestino e cervello

L'intestino e il cervello sono intimamente collegati tramite l'asse intestino-cervello, un sistema di comunicazione bidirezionale che si articola lungo vie umorali e neurali. L'espressione "asse intestino-cervello" descrive un concetto di fisiologia integrativa che incorpora tutte le comunicazioni, compresi i segnali neurali, endocrini, nutritivi e immunologici afferenti ed efferenti tra il sistema nervoso centrale e il sistema gastrointestinale (Romijn et al., 2008).

Un importante passo avanti nella ricerca e nella comprensione dell'interazione è avvenuto grazie alla scoperta del Sistema Nervoso Enterico (SNE) durante la metà del XIX secolo. Ciò che ha conferito rilievo a tale sistema sono senza dubbio le sue dimensioni, la sua complessità, e la somiglianza – dovuta alla tipologia di neurotrasmettitori presenti – con il cervello. Queste caratteristiche hanno determinato in seguito l'uso dell'appellativo "secondo cervello" affibbiato al SNE, anche se ad oggi

viene classificato come la terza componente del Sistema Nervoso Autonomo (SNA), insieme al sistema nervoso simpatico e parasimpatico. Sebbene già prima della scoperta del SNE fosse sotto osservazione la dinamica tra intestino e cervello e la relativa connessione con le condizioni di salute e di malattia, le scoperte provenienti dai campi di ricerca delle neuroscienze, della microbiologia intestinale, delle interazioni microbiche e, più recentemente, dell'influenza del microbiota intestinale nella comunicazione intestino-cervello, hanno spinto i ricercatori a rivolgere maggiore attenzione alle dinamiche tra i due organi (Mayer, 2011). Inizialmente la ricerca si è focalizzata sul tentativo di comprendere le basi sottostanti ai disturbi gastrointestinali, quale per esempio la sindrome dell'intestino irritabile (SII). Presto, il campo di osservazione si è allargato verso ambiti non solo neurologici, ma anche psicologici e psichiatrici.

Ai fini di una comprensione ottimale delle manifestazioni - sia omeostatiche che di malattia - connesse all'asse, è necessario delineare i percorsi che collegano l'intestino e il cervello. Innanzitutto, occorre fare una prima introduzione semplicistica, al fine di individuare i principali canali protagonisti dell'interazione: il sistema nervoso, il sistema immunitario e il sistema endocrino. I sistemi linfatico e circolatorio giocano anch'essi un ruolo significativo, ma risulta essere secondario rispetto ai tre canali appena nominati (Anderson et al., 2017). Come accennato in precedenza, sono implicate connessioni neurali e umorali; le prime coinvolgono il sistema nervoso centrale, autonomo ed enterico, mentre nelle seconde entrano in gioco l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, il sistema enteroendocrino e il sistema immunitario mucosale (Collins et al., 2012).

Il dialogo vigente tra intestino e cervello è il substrato neurobiologico che regola i normali processi digestivi di un individuo in salute, e li integra con lo stato fisico ed emotivo generale dell'organismo. Ciò è ottenuto dall'intricata integrazione di segnali afferenti omeostatici (enterocettivi) intestino-cervello con input da sistemi sensoriali esterocettivi, il sistema di ricompensa (imputato alla valutazione degli aspetti edonico e/o motivazionale degli stimoli), nonché circuiti cognitivi e affettivi nel cervello (Val Oudenhove et al., 2016; Weltens et al., 2018).

1.3.1 Le modalità di segnalazione efferente: la trasmissione dal SNC all'intestino e l'influenza sul microbioma intestinale

Per concettualizzare l'effetto dei processi mediati dal SNC sulle funzioni corporee, inclusa la risposta immunitaria dell'intestino, è stato introdotto il termine "sistema motorio emotivo". Il Sistema Motorio Emotivo (EMS in Figura 2) si riferisce a diversi sistemi di output paralleli (compresi i rami simpatico e parasimpatico del sistema nervoso autonomo, l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e le vie endogene che modulano il dolore e il disagio) che mediano l'effetto degli stati emotivi su una vasta gamma di sistemi corporei, inclusa la funzione gastrointestinale. L'attivazione di uno qualsiasi di questi sistemi, da solo o in combinazione, ha il potere di influenzare il microbiota enterico sia indirettamente, attraverso cambiamenti nell'ambiente, sia direttamente, tramite la segnalazione ospite-microbiota (Rhee et al., 2009).

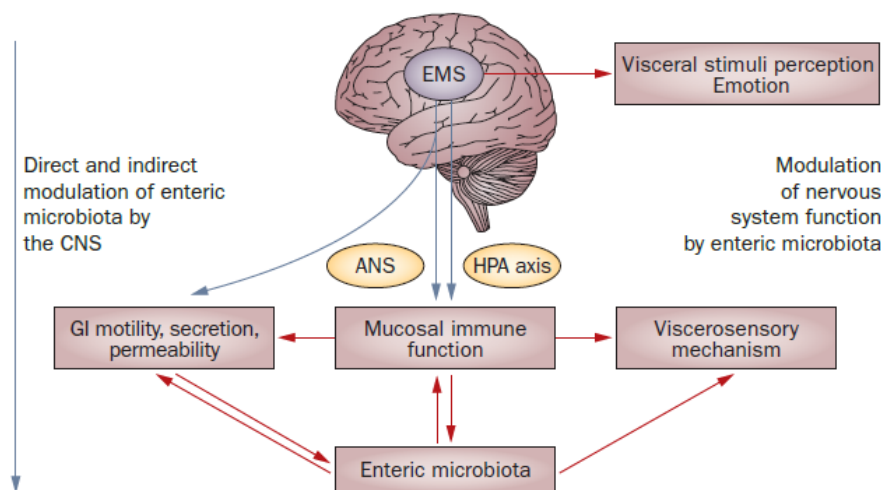


Figura 2: Rappresentazione schematica delle interazioni bidirezionali nell'asse microbiota-intestino-cervello. Il cervello modula varie funzioni dell'intestino attraverso flussi di segnalazione paralleli definiti nell'insieme "sistema motorio emotivo". Anche il microbiota enterico può interagire con i sistemi effettori dislocati nell'intestino e con le vie di segnalazione viscerale afferente, determinando una comunicazione reciproca tra i membri dell'asse. Abbreviazioni: EMS, sistema motorio emotivo; ANS, sistema nervoso autonomo; HPA, ipotalamo-ipofisi-surrene; GI, gastrointestinale (Rhee et al., 2009).

La modalità principale con cui il SNC comunica con il tratto gastrointestinale prevede la regolazione centrale della sazietà, la quale prevede il rilascio di peptidi regolatori. La modificazione della propria alimentazione in seguito al controllo operato dal SNC può contribuire a determinare un impatto sulla disponibilità di nutrienti per il microbioma intestinale e, di conseguenza, sulla sua composizione (Wang & Kasper, 2014).

Una seconda modalità di trasmissione, in questo caso neurale, prevede il contributo del SNA. Più specificamente, i rami efferenti simpatico e parasimpatico collegano direttamente i circuiti dell'*arousal* emozionale e del *Central Autonomic Network* (CAN)¹ con il SNE che, a sua volta, innerva la muscolatura liscia viscerale e altre strutture degli organi terminali. Insieme al SNA, l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e i circuiti centrali che li controllano costituiscono il principale sistema di diffusione dello stress, nonché la più importante via di segnalazione che collega il cervello all'intestino. Lo stress psicologico e fisiologico aumenta il tono simpatico e diminuisce l'attività del sistema parasimpatico; tale combinazione di azioni altera la funzione del SNE. Inoltre, lo stress determina l'attivazione dell'asse HPA attraverso la stimolazione dell'ipotalamo, con conseguente rilascio di cortisolo. Gli effetti di queste innervazioni presentano ampi spettri di manifestazione: oltre ad influenzare le funzioni gastrointestinali secretorie, le funzioni sensoriali, motorie, endocrine e immunitarie, lo stress può alterare la composizione del microbiota intestinale, nonché la permeabilità dell'intestino. (Cryan & Dinan, 2012; Wang & Kasper, 2014; Weltens et al., 2018). Lo stress aumenta anche la concentrazione di noradrenalina nel lume intestinale, fattore che potrebbe contribuire ai cambiamenti nella composizione microbica. A tale proposito, è noto che le catecolamine, inclusa la noradrenalina, alterano l'espressione genica in alcuni batteri, determinando così una crescita preferenziale di alcune comunità all'interno dell'intestino (Collins et al., 2012).

L'alterazione della mucosa intestinale può consentire la traslocazione batterica, che a sua volta può determinare un aumento dei livelli di citochine pro-infiammatorie locali e sistemiche, così come un aumento del rilascio di serotonina (5-idrossitriptamina (5-HT)) da parte delle cellule enteroendocrine. Questi processi possono indurre cambiamenti nella trasmissione afferente, in particolare determinando un aumento della segnalazione dall'intestino al cervello. A lungo termine, ciò può portare a disfunzioni dei circuiti cerebrali di elaborazione e modulazione del dolore, nonché di regolazione dello stress, creando così un circolo vizioso di interazioni bidirezionali intestino-cervello

¹ La rete autonoma centrale (CAN) è una componente integrante di un sistema di regolazione interna mediante il quale il cervello controlla le risposte visceromotorie, neuroendocrine, dolorose e comportamentali essenziali per la sopravvivenza. Comprende la corteccia insulare, l'amigdala, l'ipotalamo, la materia grigia periacqueduttale, il complesso parabrachiale, il nucleo del tractus solitarius e il midollo ventrolaterale (Benarroch, 1993, October).

disadattive, che possono manifestarsi clinicamente come rinforzo reciproco dei sintomi gastrointestinali e affettivi (Weltens et al., 2018).

Un'ulteriore modalità di comunicazione prevede il coinvolgimento delle vie immunitarie con la possibile produzione di modulatori dell'inflammatione, come per esempio le citochine. Anche in questo caso, i prodotti secreti influenzano la sopravvivenza e l'ambiente enterico di residenza del microbiota (Figura 3) (Weltens et al., 2018; Wang & Kasper, 2014).

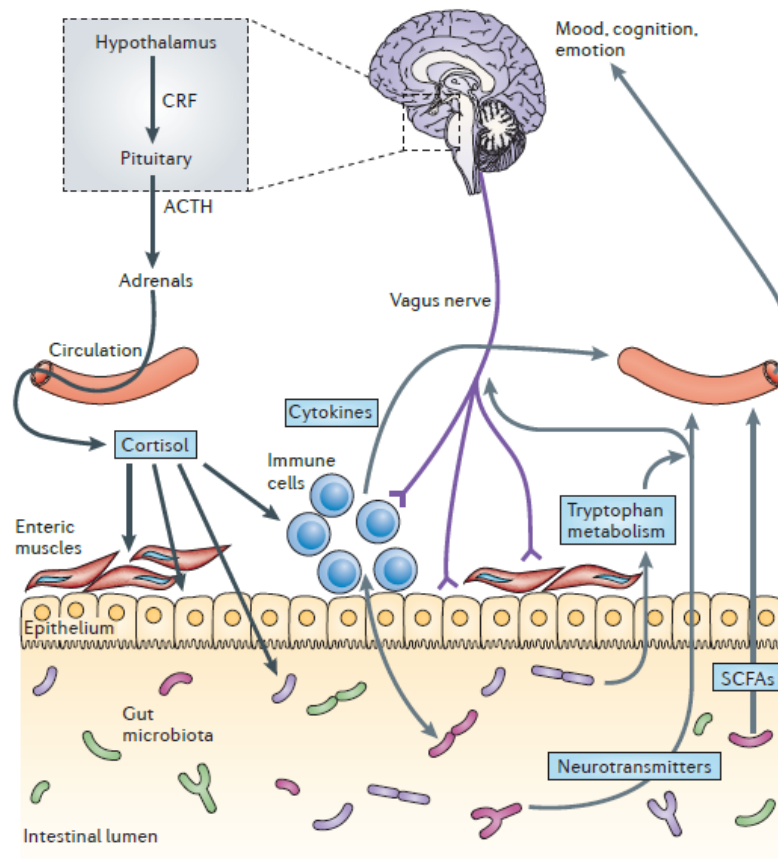


Figura 3: I percorsi coinvolti nella comunicazione bidirezionale tra il cervello e il microbiota intestinale. I percorsi attraverso cui il microbiota enterico può modulare l'asse intestino-cervello includono le vie endocrine (cortisolo), le vie immunitarie (citochine) e neurali (il nervo vago e il sistema nervoso enterico). Il cervello recluta i medesimi canali per alterare la composizione microbica dell'intestino, per esempio nel corso di esposizione allo stress. Tale condizione attiva l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e determina il rilascio di cortisolo, il quale ha il potere di influenzare le cellule immunitarie, alterare la permeabilità della barriera intestinale così come la funzione e la composizione microbica. Di contro, il microbiota può influenzare umore, cognizione e comportamento anche attraverso il metabolismo del triptofano e gli SCFA. Abbreviazioni: SCFAs, acidi grassi a catena corta; ACTH, ormone adrenocorticotropo; CRF, fattore di rilascio della corticotropina (Cryan & Dinan, 2012).

1.3.2 Le modalità di segnalazione afferente: la segnalazione dall'intestino al SNC e l'influenza operata dal microbioma intestinale

I nervi afferenti spinali e vagali trasmettono segnali dal tratto gastrointestinale al tronco cerebrale e ai circuiti cerebrali sensomotori, i quali modulano e subiscono la modulazione dalle reti affettive e cognitive (cioè, i percorsi "dal basso verso l'alto", dalla periferia del corpo al cervello).

Oltre a queste vie viscerosensoriali, i meccanismi di segnalazione intestino-cervello includono anche una moltitudine di ormoni peptidici secreti dalle cellule enteroendocrine localizzate lungo l'intestino, in particolare le cellule enterocromaffini. Oltre a regolare la motilità e la sensibilità gastrointestinale, i peptidi prodotti segnalano anche lo stato metabolico dell'organismo - tramite percorsi umorali e neurali (attraverso i recettori sulle afferenze vagali) - ai circuiti cerebrali omeostatici situati nel tronco cerebrale e nell'ipotalamo, regolando così l'assunzione di cibo e il bilancio energetico in funzione delle risorse energetiche possedute dall'organismo e dei fabbisogni nutrizionali. In questo modo, le cellule enterocromaffini fungono da trasduttori per la comunicazione endocrina tra intestino e SNC (Rhee et al., 2009; Weltens et al., 2018). Di notevole importanza è l'azione operata sul metabolismo del triptofano, un prodotto delle cellule enterocromaffini e precursore di molti agenti biologicamente attivi, inclusa la serotonina. L'intestino è il più grande deposito di serotonina del nostro organismo: in esso è immagazzinato più del 95% di questo neurotrasmettitore, il quale gioca un ruolo fondamentale all'interno dell'asse intestino-cervello. Oltre ad essere indispensabile per il corretto funzionamento intestinale, è essenziale per funzioni vitali quali per esempio il sonno, il dolore, l'appetito, la sensibilità al dolore, così come anche l'umore e il benessere generale.

Un'ulteriore influenza endocrina del microbiota intestinale è rappresentata dal suo ruolo di rilievo nello sviluppo e nella regolazione dell'asse HPA, deputato alla risposta allo stress (Mayer, 2011; Cryan & Dinan, 2012; Wang & Kasper, 2014; Mayer, 2016; Martin et al., 2018).

Per quanto concerne la via neurale, è stato dimostrato che la modulazione probiotica del microbiota intestinale influenza le funzioni neuro-motorie intestinali.

Inoltre, come accennato poc'anzi, si è visto che i recettori presenti sui nervi vagali afferenti si legano a molti dei peptidi prodotti nell'intestino, determinando una trasmissione dei segnali al SNC. Si può dunque affermare che l'attivazione vagale sia necessaria per una serie di effetti indotti dal microbiota intestinale sulle funzioni cerebrali (Cryan & Dinan, 2012; Wang & Kasper, 2014).

L'influenza del microbiota si estende anche a livello metabolico: i batteri intestinali modulano varie reazioni dell'ospite, con conseguente produzione di metaboliti come gli acidi biliari, la colina e gli acidi grassi a catena corta (SCFA), essenziali per la salute dell'organismo. Più nel dettaglio, i carboidrati complessi possono essere digeriti e in seguito fermentati nel colon ad opera dei microrganismi intestinali, i quali li trasformano in acidi grassi a catena corta come n-butirrato, acetato e propionato. Gli SCFA sono noti per avere effetti neuroattivi: in particolare, il butirrato è la migliore fonte energetica per le cellule epiteliali dell'intestino. Per di più, esso può raggiungere il cervello e indurne lo sviluppo attraverso la stimolazione dei fattori di crescita, o agire come un antidepressivo. Inoltre, è stato dimostrato il coinvolgimento del butirrato in patologie quali l'obesità, il diabete, malattie infiammatorie e neurologiche (Cryan & Dinan, 2012; Anderson et al., 2017). I batteri intestinali possono produrre una vasta gamma di molecole neuroattive come la serotonina, la melatonina, l'acido gammaminobutirrico (GABA), le catecolamine, l'istamina e l'acetilcolina (Cryan & Dinan, 2012).

Infine, il microbioma intestinale svolge un ruolo determinante anche nell'attivazione della risposta immunitaria. Il sistema immunitario innato e adattivo collabora per mantenere l'omeostasi sulla superficie luminale dell'interfaccia microbica intestinale, cruciale per il mantenimento della salute. Il sistema in questione esercita anche una comunicazione bidirezionale indipendente con il SNC, il che lo rende l'obiettivo primario per la trasduzione degli effetti dei batteri a livello centrale. Inoltre, le influenze indirette del microbiota intestinale e dei probiotici sul sistema immunitario innato possono provocare alterazioni nei livelli circolanti di citochine pro-infiammatorie e antinfiammatorie, che hanno un'influenza diretta sul funzionamento cerebrale (Figura 3) (Cryan & Dinan, 2012; Wang & Kasper, 2014).

Le citochine pro-infiammatorie sono state implicate in una serie di disturbi psichiatrici, inclusa la depressione. Sono stati condotti diversi preclinici e clinici che

hanno dimostrato che la manipolazione della composizione microbica intestinale influenza i livelli di citochine sistemiche. È possibile, quindi, che alterazioni del microbiota intestinale influenzino il comportamento attraverso la modificazione dei livelli di citochine nella circolazione sistemica e nel cervello. In condizioni normali, esiste un delicato equilibrio tra il microbiota e il sistema immunitario innato della mucosa intestinale; i cambiamenti nella composizione microbica indotti da antibiotici o probiotici mettono a repentaglio questo equilibrio, determinando profili di citochine alterati, con conseguenze appartenenti anche allo spettro patologico (Collins et al., 2012).

A tale proposito, è importante sottolineare che ci sono prove che la permeabilità della barriera ematoencefalica sia influenzata dal microbiota intestinale: alcuni rapporti mostrano che i topi privati dai germi risentono di una maggiore permeabilità cerebrale rispetto ai topi di controllo, in parte a causa della ridotta espressione di proteine a giunzione stretta. Infezioni, malattie autoimmuni e lesioni possono alterare l'integrità della BEE, aumentando così l'accessibilità cerebrale ai prodotti microbici nel sistema circolatorio e sensibilizzando il cervello alla manifestazione di una successiva patologia. In effetti, un'elevata permeabilità della BEE è una caratteristica distintiva di molte condizioni neuropatologiche; tale dato evidenzia ulteriormente il potenziale impatto delle connessioni tra l'immunità sistemica e le ripercussioni nel cervello (Morais et al., 2021).

1.4 La sottile linea tra disagio organico e psicologico

I canali di comunicazione appena delineati offrono una panoramica della vasta gamma di interazioni tra i componenti dell'asse microbiota-intestino-cervello, permettendo così di prefigurarsi le possibili manifestazioni conseguenti alla modificazione del suo equilibrio. La scoperta dell'interazione dinamica tra intestino e cervello ha determinato un vero e proprio cambio di prospettiva nella comprensione di numerose patologie, soprattutto dal punto di vista dei sintomi causati e del processo eziologico annesso. Non è immediato comprendere fino a che punto si estendono le manifestazioni della stretta connessione cerebro-intestinale, soprattutto in vista della natura silente della maggior parte dei segnali che vengono trasmessi all'interno dell'interazione.

La gamma di output provenienti dall'intestino genera non solo sensazioni come quelle di sazietà e benessere al termine di un buon pasto, nausea o disagio, ma provoca anche risposte da parte del cervello, dando luogo a reazioni somatiche. Tali reazioni

possono rappresentare la diretta conseguenza delle emozioni esperite, ma non solo, possono anche esserne la causa: i microbi che risiedono nell'intestino ricevono informazioni sul nostro stato emotivo, sul quale possono influire mediante la generazione e la modulazione di segnali che vengono inviati al cervello; ciò implica che l'emozione, una volta indotta una reazione somatica nell'intestino, possa intensificarsi o a volte prolungarsi in seguito alla ritrasmissione intestino-cervello (Mayer, 2016).

È considerevole il numero di casi che presenta reazioni somatiche anomale, alla base delle quali risulta spesso ostica l'individuazione della causa scatenante. Il gastroenterologo di fama mondiale Emeran Mayer (2016) risalta spesso quanto, anche a livello medico, venga sottovalutata l'intricata connessione cerebro-intestinale e i relativi effetti nella nostra salute, con la diretta conseguenza della mancata cura di problematiche anche molto dolorose e debilitanti. Ciò che più viene sottovalutato è il ruolo determinante che possono avere le emozioni sulla condizione di benessere, sia sul piano fisiologico che sul piano psicologico. Di notevole rilievo è senza dubbio il ruolo dello stress sulla nostra salute: alla base di diversi disturbi cerebro-intestinali o, più in piccolo, di reazioni somatiche atipiche, è stata spesso rintracciata una risposta iperattiva allo stress a livello cerebrale, con la conseguente manifestazione di una perturbazione dell'equilibrio intestinale e microbico che si traduce nella contrazione di sintomi quali per esempio nausea, dolore, diarrea, vomito o disagio generale (Mayer, 2000).

La condizione probabilmente più rappresentativa del dialogo tra cervello e intestino e della linea (spesso non rintracciabile) che separa il disagio fisiologico da quello psicologico, è quella dei disturbi gastrointestinali cronici, in particolare la sindrome dell'intestino irritabile. Tale sindrome appartiene alla classe dei FGID, i disturbi gastrointestinali funzionali: si tratta di "un gruppo eterogeneo di disturbi caratterizzati da dolore e disagio cronicamente ricorrenti che vengono veicolati in diverse regioni del tratto gastrointestinale. Sono spesso associati ad alterazioni della funzione gastrointestinale e caratterizzati dall'assenza di anomalie biologiche, fisiologiche o anatomiche concordate che spieghino i sintomi" (Mayer, 2011 p. 11; Grenham et al., 2011). Dato interessante è senza dubbio la mancanza di un'anomalia biologica che spieghi la cronicità esperita da chi soffre di tali condizioni; forse più interessante, è che si riscontra una comorbidità con la depressione e i disturbi d'ansia nella SII, pari rispettivamente a circa il 30% e il 30-50% dei casi. Inoltre, livelli più elevati di sintomi di ansia e depressione costituiscono un

fattore di rischio per lo sviluppo di un FGID in seguito e, per di più, i pazienti con un FGID mostrano livelli più elevati di sintomi di depressione e ansia al follow-up (Weltens et al., 2018). Benché ad oggi non sia del tutto chiaro il funzionamento patologico dei FGID, queste caratteristiche conferiscono alle condizioni appena trattate la peculiarità di essere patologie cerebro-intestinali.

La comorbidità di patologie intestinali si riscontra in numerosi disturbi, tra i quali quelli depressivi e d'ansia, ma anche i disturbi dello spettro autistico (DSA). Sebbene la genetica svolga un ruolo importante nell'eziologia dei DSA, negli ultimi anni è emerso un interesse emergente per il potenziale ruolo dei fattori ambientali in questa condizione. Tra i fattori di rischio ambientale associati, le anomalie gastrointestinali e la composizione alterata del microbiota sono state identificate in numerosi studi su piccola scala su bambini con DSA (Finegold et al., 2002; Finegold et al., 2010); inoltre, è stata trovata una correlazione con la gravità dei sintomi (Adams et al., 2011). A sostegno di questi risultati, la percentuale di pazienti con una diagnosi di DSA che presenta sintomi gastrointestinali raggiunge il 40%, e molti di questi individui soddisfano i criteri diagnostici per la SII (Mayer, 2016).

Anche il morbo di Parkinson presenta sintomi gastrointestinali: prevede tra i sintomi una degenerazione del sistema nervoso enterico, la quale precede la comparsa della sintomatologia cognitiva e motoria classica ed è caratterizzata da un'alterazione nella composizione microbica intestinale di chi ne soffre (Mayer, 2016).

1.5 Il ruolo dello stress nella dinamica cerebro-intestinale

Lo stress è stato descritto per la prima volta da Seyle (1936) come una minaccia acuta per l'omeostasi di un organismo. Un evento avverso, o fattore di stress, sia esso la presenza di una minaccia reale (fattore di stress fisico) o l'anticipazione di una minaccia (fattore di stress psicologico), induce una combinazione di reazioni fisiologiche, emotive e comportamentali che permette all'individuo di affrontare adeguatamente la situazione. Tuttavia, fattori di stress gravi, cronici e incontrollabili possono innescare cambiamenti disadattivi nella struttura e nella funzione del cervello, con conseguenze a lungo termine sul proprio benessere fisico e mentale (Lupien et al., 2009; McEwen, 2012).

La risposta allo stress è generata dalla complessa integrazione di una serie di regioni cerebrali interconnesse, in particolare l'amigdala, l'ippocampo e il nucleo

paraventricolare dell'ipotalamo; inoltre, tali aree ricevono input modulatori anche dalle regioni corticali superiori, come la corteccia prefrontale. L'output principale del circuito centrale dello stress si esplica a partire dall'asse neuroendocrino HPA e dal SNA (Moloney et al., 2014). L'asse HPA è un insieme complesso di influenze involontarie e interazioni di feedback tra tre ghiandole endocrine: l'ipotalamo, la ghiandola pituitaria e le ghiandole surrenali. Il suo ruolo non si esplica unicamente nel controllo della reazione del corpo allo stress, ma implica anche la regolazione della digestione, del sistema immunitario, dell'umore e dello stato emotivo, della sessualità e dell'immagazzinamento e del dispendio di energia. La risposta allo stress dell'asse HPA induce la secrezione del fattore di rilascio della corticotropina (CRH) da parte dei neuroni nella porzione parvocellulare mediale del nucleo paraventricolare ipotalamico, che induce le cellule endocrine (corticotrope) dell'ipofisi anteriore a secernere l'ormone adrenocorticotropo (ACTH). L'ormone adrenocorticotropo, a sua volta, stimola le cellule endocrine, principalmente nella zona fascicolata della corteccia surrenale, a secernere gli ormoni glucocorticoidi cortisolo e/o corticosterone (come semplificato nella Figura 3) (Mohajeri et al., 2018).

Lupien et al. (2009) sostengono che l'esposizione cronica agli ormoni dello stress ha un potenziale impatto sulle strutture cerebrali coinvolte nella cognizione e nella salute mentale; a fare da mediatore di questa relazione è senza dubbio il periodo, all'interno dell'arco di vita, entro il quale si colloca la condizione stressogena, ma anche la durata di tale esposizione. Per di più, un fattore che gioca un ruolo cruciale è la relazione tra gli effetti genetici e le avversità ambientali affrontate.

La ricerca in corso sia sull'uomo che sugli animali ha dimostrato che i fattori di stress emotivo possono avere un impatto negativo anche sulla microflora intestinale. Alcuni eventi stressanti della vita sono stati associati all'esordio o all'esacerbazione dei sintomi in alcuni dei più comuni disturbi cronici dell'apparato digerente, inclusi disturbi gastrointestinali funzionali, malattie infiammatorie intestinali (IBD), malattia da reflusso gastroesofageo (GORD), e ulcera peptica (PUD) (Mayer, 2000).

Uno dei principali meccanismi proposti alla base delle alterazioni indotte dallo stress è il fenomeno del *leaky gut*, un segno particolarmente evidente nei pazienti affetti da depressione maggiore. Il meccanismo d'azione fa sì che la barriera epiteliale del tratto gastrointestinale venga compromessa a causa dell'esposizione a stress di natura

psicologica oppure organica, con un conseguente aumento della permeabilità intestinale e la traslocazione di batteri gram-negativi attraverso il rivestimento della mucosa in siti dove può verificarsi l'interazione diretta con le cellule immunitarie e il SNE. Ciò porta all'attivazione di una risposta immunitaria caratterizzata da una maggiore produzione di mediatori dell'infiammazione, riscontrata anche nei pazienti con depressione maggiore (Moloney et al., 2014).

I modelli animali di disturbi legati allo stress hanno permesso di giungere a importanti conclusioni: è stato dimostrato che la separazione materna, le condizioni di contenimento, l'affollamento, lo stress da calore e lo stress acustico alterano la composizione del microbiota. Il modello di separazione materna rappresenta uno dei modelli più esplicativi della relazione vigente tra stress e alterazione della flora batterica intestinale: tale rapporto si evidenzia nella dinamica che mette in relazione gli eventi avversi della prima infanzia associati a un sistema di risposta allo stress disadattivo, con la conseguente esacerbazione della vulnerabilità a diverse malattie in età avanzata, dalla depressione alla sindrome dell'intestino irritabile (Moloney et al., 2014).

O'Mahony (2009) ha messo a punto uno studio al fine di valutare l'effetto dello stress precoce sull'asse intestino-cervello: cuccioli di ratto maschio sono stati sottoposti allo stress provocato dalla separazione materna per tre ore al giorno nell'arco dei primi giorni successivi alla nascita. Il gruppo di controllo dell'esperimento è stato invece lasciato indisturbato a contatto con la madre. Tale manipolazione sperimentale è partita dal presupposto che la separazione materna è un potente fattore di stress che provoca alterazioni comportamentali permanenti associate a cambiamenti dell'asse HPA. Il periodo neonatale di un ratto è caratterizzato da una debole risposta allo stress, la quale può subire l'effetto deleterio indotto dalla presenza di un forte evento stressante, come può essere, appunto, l'allontanamento dalla madre. Tale condizione è associata ad un aumento immediato della quantità di CRH nei neuroni ipotalamici, e ad un suo aumento in risposta allo stress anche in età adulta. L'influenza degli eventi avversi nell'infanzia sull'età adulta è, di conseguenza, indice di un potenziale effetto sulla comunicazione cerebro-intestinale. In particolare, l'esposizione alla separazione materna ha dato risultati importanti: i ratti sottoposti alla condizione di stress hanno mostrato diversi cambiamenti fenotipici, che si traducono in comorbidità ansia/stress e disturbi intestinali funzionali. Questi effetti si verificarono a livello multifunzionale: si riscontrarono alterazioni

comportamentali espressive di un aumento dell'ansia e ipersensibilità viscerale, e alterazioni fisiologiche, tra cui elevata funzione dell'asse HPA e aumento delle risposte immunitarie sistemiche; infine, sono state osservate anche perturbazioni nel microbiota intestinale.

Insieme, questi dati indicano che lo stress precoce induce cambiamenti persistenti che potrebbero contribuire alla suscettibilità a sviluppare disturbi stress-relati come la SII e i disturbi psichiatrici in età adulta (O'Mahony et al., 2009).

Alla luce della relazione reciproca che esiste tra la risposta allo stress e il microbiota, non sorprende che il periodo più critico per lo sviluppo dell'asse HPA e la programmazione della risposta neuroendocrina allo stress, ovvero l'inizio della vita postnatale, sia anche un momento importante per la costituzione del microbiota intestinale centrale (Moloney et al. 2014).

L'associazione tra microbiota e reattività allo stress è ulteriormente supportata dagli studi che hanno confrontato i topi che non hanno subito l'esposizione ai microrganismi (GF; germ-free) e i roditori trattati con probiotici e/o antibiotici. I risultati seminali di Sudo et al. (2004) sostengono una maggiore attività dell'asse HPA nei topi GF a seguito di uno stress psicologico acuto: questo dato ha fornito la prima prova convincente del ruolo essenziale svolto dal microbiota nella programmazione della risposta allo stress.

L'effetto sulla composizione microbica intestinale e sul suo equilibrio è stato riscontrato anche negli studi su animali che hanno manipolato lo stress su madri incinte, per poi osservare i risultati conseguenti sulla prole. Jašarević et al. (2015) hanno stressato femmine di ratto incinte esponendole a situazioni spiacevoli. In seguito all'esposizione, i ricercatori hanno rilevato importanti modifiche nel microbioma vaginale dei topi, in particolare la riduzione dei lactobacilli, noti per la loro capacità di modificare l'acidità dell'ambiente vaginale e predisporre l'organismo a infezioni. Dal momento che la colonizzazione intestinale, il metabolismo e la maturazione immunitaria della prole dipendono innanzitutto dall'esposizione al microbiota vaginale materno durante il parto come fonte primaria di influenza, l'obiettivo è stato quello di verificare se vi fossero alterazioni nel microbiota intestinale dei piccoli di madri sottoposte a situazioni stressanti. In effetti, venne rilevato un minor numero di lactobacilli nella prole delle madri stressate.

Questi risultati da un lato dimostrano come la composizione microbica sia sensibile allo stress e trasmissibile attraverso il parto, dall'altro incentivano a prestare attenzione al periodo critico del neurosviluppo entro il quale tale trasmissione si verifica, con conseguenze significative per la prole che si possono protrarre a lungo termine. Poiché il cervello in via di sviluppo mostra una richiesta metabolica sostanzialmente elevata durante questa finestra critica, la colonizzazione di una comunità microbica disbiotica può influenzare l'efficienza del metabolismo dei nutrienti e la disponibilità di substrati energetici circolanti necessari per il normale sviluppo (Jašarević et al., 2015; Mayer, 2016).

Capitolo 2

Come cambia il microbiota nel corso della vita: la relazione con il neurosviluppo

Il microbiota intestinale subisce dei cambiamenti nel corso dell'esistenza di un individuo, in particolare in termini di diversità e di abbondanza. È stato rilevato che queste proprietà sono ridotte nel corso dei primi tre anni di vita, periodo in cui è in corso la formazione di un microbioma stabile; raggiungono poi il massimo sviluppo durante la vita adulta, per poi diminuire nuovamente nell'età avanzata.

Si può affermare che esiste un'interazione tra lo sviluppo neurologico e la formazione del microbiota: si tratta di due percorsi che si estendono in parallelo e che hanno finestre di vulnerabilità simili. Negli ultimi anni l'asse microbiota-intestino-cervello è emerso come un attore chiave del neurosviluppo: eventi avversi che avvengono nelle fasi di vita iniziali, in cui ha inizio la colonizzazione e la formazione del microbiota, hanno il potenziale effetto di determinare la salute fisica e mentale anche in età avanzata.

È importante sottolineare che l'infanzia e l'adolescenza sono le fasi di cambiamento più dinamiche in relazione al microbiota e allo sviluppo del cervello. Pertanto, alterazioni dell'equilibrio tra microbiota e organismo ospite possono tradursi in una profonda perturbazione dell'asse cerebro-intestinale, con conseguenti influenze sulla salute in generale, come l'aumento del rischio di sviluppare disturbi dello sviluppo neurologico (Borre et al., 2014a).

2.1 Il periodo prenatale

Di contro al dogma comune secondo cui l'ambiente intrauterino e il feto rimangono sterili fino al parto, alcune prove sostengono la presenza di batteri già nel periodo prenatale, suggerendo una possibile influenza da parte del microbiota materno prima della nascita del bambino. La formazione di un microbiota precursore è una fase cruciale e determinante nello sviluppo neonatale, che si sovrappone a un periodo estremamente

delicato dello sviluppo cerebrale. Durante la gestazione, infatti, ha inizio la formazione del tubo neurale, la neurogenesi e la gliogenesi (lo sviluppo delle cellule gliali), con un conseguente aumento della complessità neuronale e della sinaptogenesi.

È da evidenziare che il cervello in via di sviluppo ha dimostrato di essere sensibile a segnali ambientali sia esogeni che endogeni durante la vita prenatale. Fattori quali la dieta materna, le infezioni, lo stress e le infezioni indotte da microbi patogeni durante tale periodo sono stati associati a disturbi dello sviluppo neurologico come l'autismo, il disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD) e la schizofrenia (Figura 5). In questi disturbi ha notevole rilevanza il peso dello sviluppo del sistema immunitario del bambino, che, come si è visto, è in relazione con il microbiota intestinale e soprattutto con il SNC (Marques et al., 2013). Studi sperimentali sui roditori corroborano ulteriormente la veridicità di questa nozione, dimostrando che l'esposizione a patogeni batterici durante periodi di sviluppo così sensibili può provocare anomalie comportamentali, tra cui comportamento ansioso e compromissione della funzione cognitiva (Goehler et al., 2008).

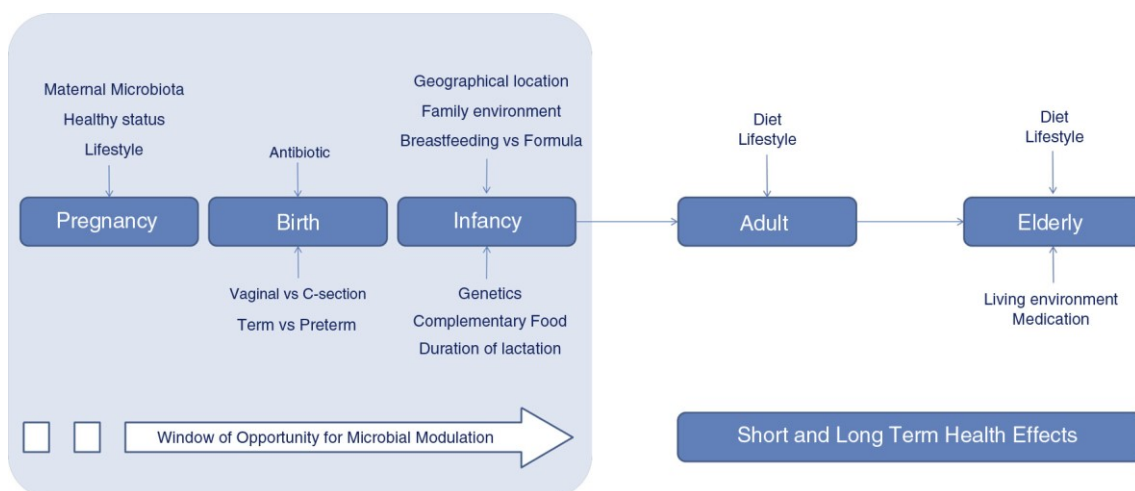


Figura 4: Fattori influenti sulla composizione del microbiota nel corso della vita. Al variare della fase dello sviluppo affrontata dall'individuo segue l'esposizione ad elementi endogeni ed esogeni che hanno la potenzialità di apportare modifiche al profilo microbico intestinale con conseguenze a breve e a lungo termine (Rodriguez et al., 2015).

La salute materna gioca un ruolo chiave nello sviluppo del microbiota e nel neurosviluppo del feto, di conseguenza l'identificazione della composizione della microflora enterica durante la gravidanza, insieme alla comprensione del suo contributo allo sviluppo del microbiota del neonato e, potenzialmente, allo sviluppo del suo cervello, possono

rappresentare un passo importante nello sviluppo di interventi di modulazione del microbiota (Figura 4) (Borre et al., 2014a; Anderson et al., 2017).

2.2 Il periodo postnatale

Durante e in seguito al parto, il bambino è esposto ai microbi che derivano principalmente dal contatto con la madre. Vi è un numero sempre maggiore di prove che sostengono quanto l'inoculazione e il successivo sviluppo del microbiota intestinale nel corso dei primi anni di vita sia cruciale per un sano sviluppo, soprattutto dal punto di vista neurologico.

I cambiamenti più rilevanti nella composizione microbica avvengono dopo la nascita, a causa dell'influenza di una vasta gamma di fattori (Figura 4): inizialmente, la modalità del parto ha un impatto sulla natura microbica dell'intestino; in particolare, i bambini nati con parto naturale sono esposti al microbiota fecale e vaginale della madre, mentre l'intestino dei bambini nati con parto cesareo viene colonizzato da un ambiente batterico strettamente correlato a quello della pelle umana e all'ambiente ospedaliero (Borre et al., 2014a; Anderson et al., 2017). A tale proposito, Mayer (2016) afferma che nei bambini nati da taglio cesareo è più probabile una proliferazione eccessiva del pericoloso microbo intestinale *Clostridium difficile*, capace di incrementare l'inclinazione all'obesità da adulti. Sebbene non sia al momento confermato, gli studiosi nutrono il sospetto che il parto cesareo esponga il neonato a una maggiore vulnerabilità verso alterazioni cerebro-intestinali e gravi disordini cerebrali, come l'autismo.

Insieme alla modalità di parto, si ritiene che anche l'età gestazionale abbia un contributo nel determinare la composizione microbica: sembra che, in caso di nascita prematura, il microbiota del bambino sia meno diversificato, anche se è possibile la compensazione con l'allattamento al seno.

Anche quest'ultimo riveste un ruolo di rilievo: i bambini allattati naturalmente hanno un microbiota più stabile rispetto ai bambini che vengono nutriti con latte artificiale, i quali mostrano invece una maggiore diversificazione microbica (Borre et al., 2014a; Anderson et al., 2017). Analizzando la nutrizione più nel dettaglio, si evidenzia che il latte materno contiene sia elementi nutritivi essenziali allo sviluppo del bambino, sia prebiotici, cioè composti in grado di nutrire determinati microbi intestinali. In particolare, attraverso il latte il bambino assume oligosaccaridi (HMO), ovvero dei

carboidrati complessi essenziali alla formazione del microbiota intestinale, a cui si aggiunge l'azione di stimolare la crescita selettiva dei batteri benefici all'organismo. Ciò che risulta affascinante a proposito degli HMO è che vengono prodotti dal corpo della donna nonostante non siano digeribili da parte dell'intestino umano. La mancata digestione permette a queste sostanze di raggiungere intatte l'intestino, dove assolvono la loro funzione di nutrimento, in particolare della specie dei *Bifidobacterium*, i quali disgregano gli HMO in acidi grassi a catena corta e altri metaboliti. I prodotti ottenuti derivati dalla disgregazione creano un ambiente che favorisce la crescita dei microbi simbiotici, a discapito dei batteri patogeni. A proposito dei bifidobatteri, si è visto che le feci dei neonati allattati mediante latte in polvere ne presentano un numero inferiore rispetto ai bambini allattati al seno (Mayer, 2016).

Un dato interessante deriva dallo studio di Kramer et al. (2008): l'allattamento al seno è risultato essere associato a migliori risultati dello sviluppo neurologico e a punteggi più alti nei test di intelligenza; rimane tuttavia da approfondire se sia la composizione del microbiota a riflettersi sullo sviluppo neurologico.

Un ulteriore fattore influente sulla natura dell'ambiente microbico intestinale è lo svezzamento e l'introduzione di cibi solidi nell'alimentazione del bambino (Borre et al., 2014a). Entro la fine del primo anno di vita, i bambini possiedono un profilo microbico individualmente distinto, convergente verso la configurazione caratteristica di un adulto; quando il bambino è nella fascia dei 2-5 anni di età, il suo microbiota assomiglia pienamente a quello di un adulto in termini di composizione e diversità. Pertanto, i primi tre anni di vita rappresentano il periodo più sensibile e delicato per gli interventi dietetici volti a migliorare la crescita e lo sviluppo infantile. Si tratta di un periodo in cui il microbiota intestinale, se alterato, ha il potenziale di influenzare profondamente la salute e lo sviluppo dell'ospite (Rodriguez et al., 2015).

In merito al neurosviluppo, è senza dubbio di primaria importanza la crucialità del periodo postnatale per la sua definizione. La generazione di nuove sinapsi avviene in maniera più prevalente dopo la nascita e all'età di due anni si raggiunge il quantitativo massimo. In seguito, il cervello subisce una fase di affinamento e di sfoltoimento – il cosiddetto *pruning* sinaptico -, in cui viene eliminato un cospicuo numero di sinapsi; questo processo è essenziale in quanto favorisce lo sviluppo del cervello (Borre et al., 2014a; Anderson et al., 2017).

2.3 L'infanzia e l'adolescenza

Dopo la colonizzazione microbica iniziale durante la nascita e il periodo postnatale, come accennato poc'anzi, il microbiota intestinale continua il suo sviluppo anche nel corso dell'infanzia e dell'adolescenza. Sebbene si rilevi una somiglianza notevole tra il profilo microbico del bambino nella fase dei 2-5 anni di età e quello dell'adulto, rimane evidente una certa instabilità e immaturità che risente dell'influenza di interferenze ambientali ad opera di fattori quali l'uso di antibiotici, la contrazione di infezioni, l'esposizione allo stress, una cattiva alimentazione (Figura 4); questi elementi possono potenzialmente indurre uno stato disbiotico, il quale ha a sua volta il potere di deteriorare la salute fisica e mentale, con il possibile sviluppo di disturbi cerebrali negli anni a seguire.

Il neurosviluppo attraversa una nota criticità nel corso dell'infanzia e ancor di più nell'adolescenza: è la fascia d'età considerata più insidiosa per lo sviluppo e l'insorgenza di diversi disturbi, tra cui la schizofrenia, i disturbi dell'umore e l'abuso di sostanze. Accanto a un microbiota instabile e immaturo, dunque, vi è un cervello vulnerabile, esposto a cambiamenti strutturali, neurochimici e molecolari in risposta ai segnali ambientali e genetici che si presentano nel corso degli anni. Uno dei mutamenti neurologici più significativi che si presentano nel corso dell'adolescenza è lo sfoltimento delle sinapsi, con la conseguente perdita di materia grigia al progredire dello sviluppo cerebrale. Dall'importante ricablaggio neuronale deriva un alto livello di vulnerabilità, che espone l'individuo adolescente a vissuti patologici che coinvolgono lo stress, l'uso di sostanze e le carenze alimentari (Figura 5) (Borre et al., 2014a).

2.4 L'età adulta e l'invecchiamento

Al giungere dell'età adulta, il microbiota intestinale diviene diversificato e stabile nel tempo, con la capacità di ripristinare la sua composizione anche di fronte a elementi ambientali dannosi come, per esempio, l'assunzione di antibiotici o l'esposizione allo stress. Queste caratteristiche vengono però a mancare all'aumentare dell'età: nell'anziano si assiste a una diminuzione della stabilità microbica intestinale, insieme a una riduzione del volume cerebrale e della funzionalità cognitiva.

Sebbene l'effetto della dieta e dell'attività fisica siano determinanti nel corso dell'intera vita, la ripercussione negativa più rilevante causata dalle carenze in entrambi gli ambiti si colloca nell'età avanzata. In aggiunta, è stato proposto che un profilo microbico intestinale alterato ha il potere di contribuire alla condizione infiammatoria e al declino dell'immunità adattiva. L'infiammazione, a sua volta, contribuisce nell'accelerare ed esacerbare gli effetti dell'invecchiamento, con la conseguente possibilità di determinare il progredire di malattie legate all'età, dai disturbi neurologici come il morbo di Alzheimer a disturbi metabolici e organici come il diabete, l'osteoporosi e le malattie cardiache. Per di più, lo stress e l'invecchiamento provocano un indebolimento delle barriere ematoencefalica e gastrointestinale, con la successiva accelerazione dell'infiammazione (Cryan et al., 2019; Borre et al., 2014a).

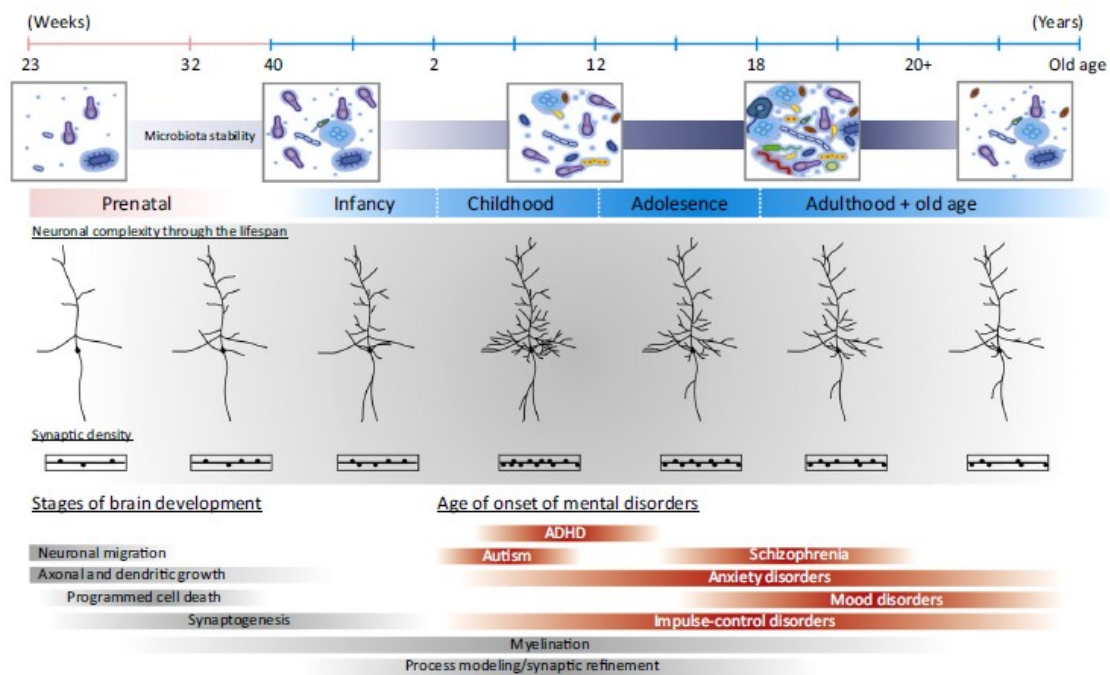


Figura 5: Quadro temporale delle fasi dello sviluppo neurologico in relazione al grado di stabilità/diversità del microbiota nel corso della vita. Al variare dei processi neurologici in atto e della composizione microbica intestinale si associa l'esposizione ai vari disturbi appartenenti ad ogni fascia d'età, dall'autismo e al disturbo da deficit di attenzione/iperattività (ADHD) durante l'infanzia, ai disturbi d'ansia e depressivi nel corso dell'età adulta (Borre et al., 2014a).

Capitolo 3

Lo studio dell'asse microbiota-intestino-cervello

La nostra comprensione dell'esatto funzionamento e degli effetti della comunicazione bidirezionale vigente tra microbiota, intestino e cervello è in continuo perfezionamento. Tuttavia, nonostante l'evidenza di un veloce progredire della conoscenza sull'interazione in esame e la consapevolezza di un suo ruolo significativo nella salute sia fisica che mentale, non siamo ancora giunti ad una totale chiarezza. Nel ridurre notevolmente le lacune hanno contribuito le strategie sperimentali e i modelli animali utilizzati dalla comunità di ricerca scientifica. Tali paradigmi hanno permesso di giungere a preziosi risultati, i quali hanno determinato l'acquisizione di importanti informazioni inerenti all'asse microbiota-intestino-cervello e le alterazioni cognitive e comportamentali derivanti da una sua alterazione. Ciò ha definito, di conseguenza, un approfondimento dell'identificazione del ruolo del microbiota nelle manifestazioni patologiche dell'uomo, soprattutto a livello cerebrale.

I risultati in tale ambito hanno senza dubbio generato grande entusiasmo riguardo alle prospettive di intervento che si sono presentate, ma è necessario porre attenzione ai limiti intrinseci al modello animale. Alcune caratteristiche del sistema nervoso centrale sono evolutivamente conservate tra le specie, consentendo così lo studio del comportamento umano e delle emozioni attraverso i modelli animali; tuttavia, è ormai ampiamente accettato che il modello animale non garantisce una perfetta ricapitolazione dell'esperienza umana. Un approccio promettente per colmare questa lacuna è l'uso di "animali umanizzati", così definiti per il trapianto di microbiota umano attuato su di essi. Essi sono stati sempre più impiegati per studi meccanicistici che mirano a studiare il contributo del microbiota intestinale nelle malattie del cervello umano. Tuttavia, è da evidenziare che i microbiomi intestinali sono sostanzialmente diversi tra le specie, per cui rimane la necessità di sviluppare metodi che sostengano l'attecchimento microbico durante il trapianto di microbiomi tra specie diverse. Inoltre, i disturbi del comportamento e del cervello sono spesso multifattoriali ed eterogenei, con sintomi che variano tra gli

individui e nel tempo. Di conseguenza, è importante lavorare con popolazioni ben caratterizzate e definite quando si effettuano studi sui trapianti di microbioma. A questa esigenza si affianca quella di seguire modelli animali di disturbi cerebrali e comportamentali con standard di validità ben definiti e stabili, caratteristiche di rilevanza cruciale al fine di tradurre i risultati rilevati nell'animale all'uomo (Morais et al., 2021).

Alla luce delle limitazioni intrinseche ai paradigmi sperimentali animali, si passeranno in rassegna i principali approcci ad oggi utilizzati (Figura 6), ponendo particolare riguardo ai risultati inerenti alla cognizione, l'emozione e il comportamento.

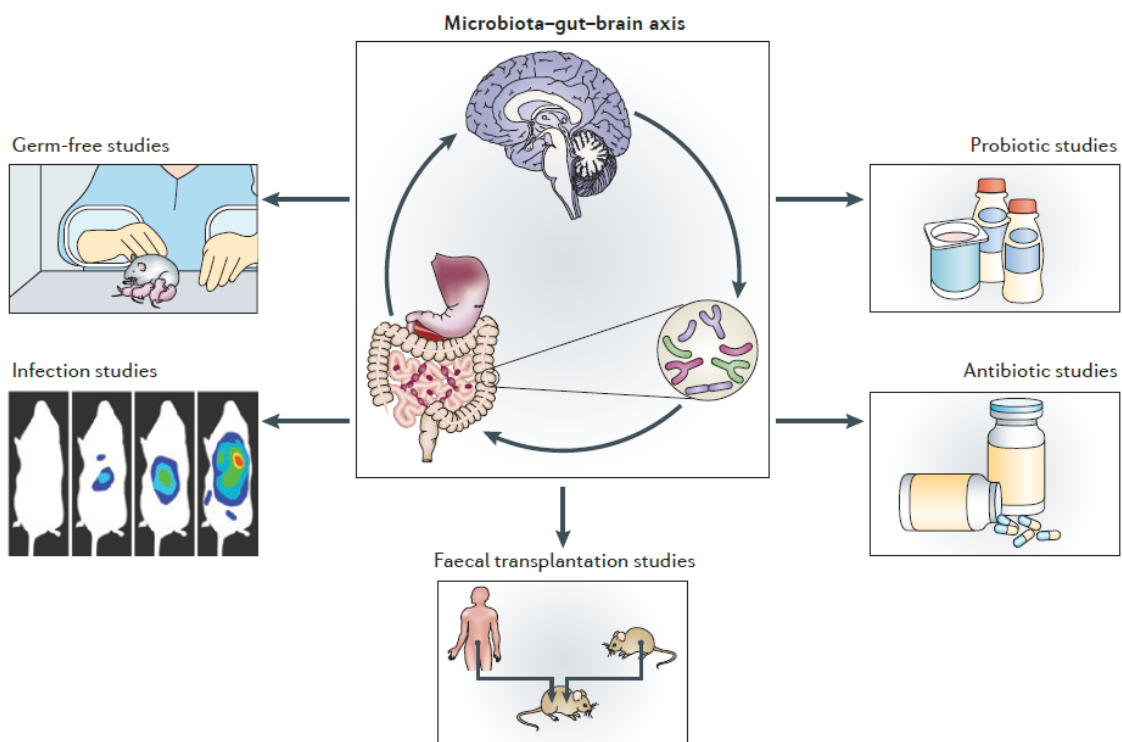


Figura 6: Le principali metodologie di studio dell'asse microbiota-intestino-cervello. Le tecniche di analisi del microbiota e dei suoi effetti nella dinamica cerebro-intestinale sono: l'utilizzo di animali privi di germi, l'induzione di infezioni, la somministrazione di probiotici e antibiotici, e il trapianto di microbioma fecale (Cryan & Dinan, 2012).

3.1 Gli animali privi di germi

Uno degli approcci utilizzati per lo studio dell'asse microbiota-intestino-cervello prevede l'utilizzo di animali *germ-free* (GF), ovvero che non presentano alcuna contaminazione da parte di microrganismi nell'intestino. Gli scienziati selezionano animali GF

(generalmente topi) facendoli nascere mediante taglio cesareo, così da evitare la trasmissione del microbiota vaginale materno, e trasferendoli immediatamente in ambienti isolati, dove aria, cibo e acqua sono sterilizzati. In assenza dell'esposizione ai germi sin dalla nascita, gli animali GF forniscono approfondimenti su come il microbiota partecipa nel plasmare il comportamento, la fisiologia e la neurobiologia del suo ospite. Queste informazioni derivano dal confronto di animali GF con animali geneticamente identici, ma allevati in condizioni normali.

Un altro possibile intervento prevede la somministrazione di un'entità batterica specifica, come per esempio un determinato probiotico, per osservare il suo impatto sull'asse dell'animale.

Ancora, come accennato po' anzi, è possibile un ampliamento dello studio sugli animali GF mediante l'umanizzazione, ovvero tramite il trapianto di microbiota fecale umano. Vale la pena notare che la traduzione clinica di tali analisi è limitata, poiché nell'uomo non esiste un'equivalente cancellazione microbica intestinale. A partire da questo presupposto, è possibile comunque sostenere la considerevole utilità degli studi su animali GF, in quanto promuovono un avvicinamento progressivo al raggiungimento della risposta alla domanda che si chiede se il microbiota enterico abbia un effetto sul comportamento, sugli aspetti cognitivi ed emozionali (Cryan & O'Mahony, 2011; Cryan & Dinan, 2012; Borre et al., 2014b; Mayer, 2016; Cryan et al., 2019).

Lo studio condotto da Sudo et al. (2004) ha apportato risultati di rilievo in questa direzione: è stato dimostrato che il microbiota intestinale può interferire con lo sviluppo dei sistemi neurali che governano la risposta endocrina allo stress, in particolare dell'asse HPA. Per lo studio sono state selezionate tre categorie di soggetti animali: topi GF, topi gnotobiotici – il cui microbiota è conosciuto, in quanto durante la crescita il topo viene esposto ad una gamma di batteri e microbi noti -, e topi con un microbiota normalmente funzionale, ma privo di patogeni (SPF, *specific pathogen free*). Per studiare la differenza nella risposta dell'asse HPA agli stimoli di stress tra i topi GF e SPF, entrambi i gruppi sperimentali sono stati sottoposti a un'ora di stress di contenzione o esposizione all'etere. È stato rilevato un aumento dell'ACTH plasmatico e del corticosterone (analogo al cortisolo nell'uomo) in risposta allo stress indotto dalla contenzione: specificamente, i valori misurati erano sostanzialmente più elevati nei topi GF rispetto ai topi SPF. Invece, nella condizione di esposizione all'etere non è stata trovata una differenza significativa

tra i due gruppi. Inoltre, i topi GF hanno anche mostrato livelli di espressione del fattore neurotrofico cerebrale BDNF (una neurotrofina chiave coinvolta nella crescita e sopravvivenza neuronale) ridotti nella corteccia e nell'ippocampo rispetto ai topi SPF. Mediante l'alterazione microbica intestinale, è stato possibile osservare come la risposta esagerata allo stress da parte dell'asse HPA nei topi GF è stata parzialmente corretta mediante la colonizzazione con materiale fecale proveniente dal gruppo di controllo SPF, mentre è stata completamente invertita mediante la somministrazione di *Bifidobacterium infantis* (uno dei batteri probiotici che viene trasmesso per primo da madre a figlio). È interessante notare che quanto prima avviene la colonizzazione, maggiore è la portata del suo effetto sulla risposta allo stress da parte dell'asse HPA. Per di più, è stato osservato che la massima correzione sui topi avviene nella condizione di contaminazione prenatale operata sulle relative madri prive di germi. Questi risultati suggeriscono che il microbiota può influenzare lo sviluppo postnatale della risposta allo stress nei topi. Dunque, l'ipotesi di un potere interferente del microbiota prende ulteriore forza, e il confronto tra animali GF e SPF ne permette la verifica.

Gli animali privi di microbiota hanno uno sviluppo e una fisiologia straordinariamente diversi rispetto agli animali con un profilo microbico normale: hanno innanzitutto una funzione intestinale compromessa, un peso corporeo inferiore e, sorprendentemente, una prospettiva di vita più lunga. In aggiunta, è stato trovato che a causa della mancanza di microbi commensali, gli animali GF risentono di un sistema immunitario deficitario, una segnalazione ormonale disregolata, un metabolismo alterato e una differente neurotrasmissione rispetto alle controparti convenzionali (Cryan et al., 2019).

Nell'insieme, i risultati fin qui evidenziati rappresentano una parte dell'utilità fornita dagli studi sugli animali privi di germi, i quali permettono una prima, superficiale ma fondamentale comprensione del potenziale del microbiota sulla vita dell'animale e, con le dovute limitazioni imposte dalla diversità che sussiste tra animale e uomo, su quest'ultimo.

3.2 Gli antibiotici

È stato ampiamente dimostrato che la somministrazione di antibiotici ad ampio spettro, frequentemente utilizzati nella pratica clinica di adulti e bambini, ha il potenziale effetto collaterale di ridurre la popolazione batterica intestinale. In particolare, viene intaccata la biodiversità del microbiota e ritardata la colonizzazione da parte dei probiotici. L'uso di farmaci antimicrobici (gli antibiotici) è uno dei metodi artificiali più comunemente usati per indurre uno stato di disbiosi nell'intestino degli animali da laboratorio. Quest'uso è nato come conseguenza dell'osservazione ripetuta di come le alterazioni nella composizione microbica del tratto gastrointestinale possano contribuire all'insorgenza sia di disordini intestinali infiammatori o funzionali, sia di comorbilità psichiatriche (Mayer, 2016).

A tale proposito, Bercik et al. (2011) hanno sperimentato sui topi l'effetto di un cocktail di tre antibiotici ad ampio spettro, tenendo sotto osservazione il profilo microbico intestinale e il comportamento prima, durante e dopo la terapia. Si osservò che la cura antimicrobica aveva indotto un'alterazione della composizione del microbiota, insieme a un aumento del comportamento esplorativo e del livello di BDNF ippocampale. I topi mostrarono una preferenza verso l'esplorazione di ambienti aperti e illuminati del contesto sperimentale piuttosto che degli ambienti bui e protetti che in genere prediligono. A esaltare la rilevanza di tali effetti è stato il riscontro della loro indipendenza dal SNA, i neurotrasmettitori gastrointestinali o lo stato infiammatorio; in altre parole, il microbiota enterico influenza la chimica del cervello e il comportamento in maniera indipendente, da cui deriva la possibilità che la condizione di disbiosi intestinale possa dare contributo a sintomi psichiatrici in pazienti che soffrono di disturbi intestinali. Un rinforzo a questa ipotesi è il riscontro, da parte dei ricercatori, della remissione degli effetti indotti dagli antibiotici: dopo due settimane dall'ultima somministrazione, sia il comportamento emotivo sia il microbiota intestinale erano tornati al loro stato normale, il che suggerì la presenza di un collegamento tra i due.

3.3 Il trapianto di microbiota fecale

Il Trapianto di Microbiota Fecale (FMT) è un processo che prevede il trasferimento del microbiota intestinale da un individuo ad un altro, e viene comunemente eseguito tramite

somministrazione orale di materiale fecale nei roditori o, nel caso dell'uomo, tramite colonscopia. Quando efficace, questa tecnica stabilisce inizialmente un microbioma simile al donatore nel tratto gastrointestinale del ricevente, il che consente di fare inferenze più forti riguardo alle relazioni causali tra il microbiota intestinale e gli esiti rilevati nell'ospite. Da non trascurare è l'utilità principale intrinseca al trasferimento del microbiota: esso rappresenta una possibile soluzione per disturbi specifici resistenti ad altro tipo di trattamento, quali le infezioni gastrointestinali croniche e le malattie infiammatorie intestinali. Attualmente, il trapianto del microbiota fecale è noto soprattutto per la sua efficacia nella cura dei casi refrattari di infezione da *Clostridium difficile*, ma non mancano evidenze a sostegno di un'utilità nel trattamento di altre problematiche, i cui sintomi sono appartenenti anche alla sfera psichica. A prova di tale affermazione, De Palma et al. (2017) hanno indagato il trasferimento dei sintomi gastrointestinali e psicologici propri della sindrome dell'intestino irritabile. Come affermato in precedenza, accanto all'alterazione della funzione intestinale, tale condizione può presentare sintomi ansiosi in comorbilità. Sulla base di questa associazione sintomatologica, gli studiosi hanno studiato gli effetti del trapianto di microbiota di individui sani o con SII, e con o senza ansia, colonizzando topi privi di germi. Si rilevò un trasferimento completo dei sintomi, da quelli gastrointestinali a quelli relativi al comportamento ansioso. Attraverso questo studio, dunque, il microbiota riceve il riconoscimento della sua influenza sia sulle manifestazioni intestinali, sia su quelle comportamentali della SII, il che porta ad ipotizzare possibili interventi terapeutici per la risoluzione dei sintomi che la caratterizzano.

In merito al trasferimento da un individuo ad un altro delle manifestazioni di carattere psicologico, la ricerca si è incentrata anche sull'osservazione dell'umore in generale, con particolare attenzione verso la sua espressione depressiva. A tale proposito, lo studio di Kelly et al. (2016) ha analizzato come la presenza di umore depresso e ansia in individui con diagnosi di depressione possa essere indotto sperimentalmente attraverso la FMT. Gli studiosi misero in atto il trapianto su ratti il cui microbiota era stato precedentemente impoverito mediante una precedente somministrazione antibiotica (in modo da evitare i limiti intrinseci all'utilizzo di topi privi di germi, caratterizzati da finestre critiche del neurosviluppo rilevanti per l'insorgenza del fenotipo depressivo). Rispetto ai topi di controllo, i topi che ricevettero il microbiota da parte di individui

depressi mostrarono un aumento del comportamento depressivo e ansioso, insieme ad alterazioni fisiologiche nel metabolismo del triptofano, nella velocità di transito gastrointestinale e nel profilo microbiotico intestinale, che subì una riduzione in termini di ricchezza e diversità. Grazie anche a questo studio, si sono mossi passi avanti verso una maggiore comprensione del coinvolgimento del microbiota come possibile causa del complesso insieme di meccanismi sottostanti allo sviluppo della depressione.

3.4 L'infezione indotta

Indagare l'impatto delle infezioni causate da patogeni enterici sul cervello e sul comportamento è una strategia importante per approfondire la conoscenza della funzione dell'asse microbiota-intestino-cervello. Una recente serie di esperimenti ha cercato di esaminare se l'infiammazione cronica dell'intestino ha il potere di alterare il comportamento. Gli studi precedentemente accennati riguardo all'infezione da parte del *Toxoplasma* o da parte del virus della rabbia sono un esempio di come l'attacco da parte di un patogeno si può tradurre in una profonda modificazione comportamentale, con manifestazioni a volte in netto contrasto con la normale abitudine dell'animale infetto.

Bercik et al. (2010) infettarono dei topi con un parassita non invasivo, il *Trichuris muris*, strettamente imparentato con il parassita umano *Trichuris trichiura*. In seguito all'infezione, gli studiosi osservarono un'infiammazione gastrointestinale da lieve a moderata e un comportamento simil-ansioso, associato ad una riduzione legata al fattore BDNF ipocampale. La manifestazione dei sintomi si riscontrò anche nei topi a cui venne effettuata una vagotomia, grazie alla quale è stato possibile osservare come l'espressione del comportamento ansioso in seguito all'infezione fosse indipendente e non venisse mediata dal nervo vago. La remissione dei sintomi si ottenne sia mediante antibiotici, sia grazie all'uso di probiotici, il cui potere benefico verrà analizzato nel prossimo paragrafo.

3.5 Probiotici e prebiotici

Il termine probiotico deriva dal significato greco "per la vita", e la prima descrizione formale di un probiotico è stata fornita da Elie Metchnikoff nel 1908 sulla base di una sua osservazione: gli individui che vivevano in una certa regione della Bulgaria avevano una

durata di vita maggiore rispetto a quelli che risiedevano in altre parti del paese; collegò questa constatazione al consumo regolare di un prodotto a base di latte fermentato, ovvero ricco di batteri lattici. Nacque dunque più di un secolo fa l'intuizione che possano esistere dei microrganismi viventi utili alla vita e promotori della salute dell'uomo (Dinan et al., 2013).

I probiotici sono dei “microrganismi vivi che, se assunti in quantità adeguate, possono apportare degli effetti benefici sulla salute dell'ospite” (Organizzazione Mondiale della Sanità, OMS); ciò avviene attraverso l'interazione con il microbiota dell'ospite e l'epitelio intestinale. A garantire il raggiungimento dell'intestino è la capacità dei probiotici di resistere all'azione del succo gastrico e della secrezione biliare e di aderire alle cellule epiteliali contrastando l'adesione da parte di agenti patogeni.

Particolare attenzione hanno ricevuto gli effetti positivi che si possono ottenere a livello psicologico mediante l'assunzione dei probiotici, il che ha determinato da una parte l'introduzione dell'appellativo di “psicobiotici”, e dall'altra ha ovviamente incoraggiato la ricerca verso l'uso dei probiotici in qualità di nuovo approccio terapeutico per la cura dei disturbi psicologici e psichiatrici.

Una quantità sempre in crescita di studi conferma che gli psicobiotici esercitano effetti ansiolitici e antidepressivi caratterizzati da cambiamenti negli indici emotivi, cognitivi, sistemici e neurali (Sarkar et al., 2016). Nello studio di Sudo et al. (2004) citato in precedenza, si è visto come, grazie all'uso di un probiotico, si è ottenuta una reversibilità della risposta legata allo stress, rilevata iper-espressa nei topi privi di germi in confronto ai topi dotati di una funzionalità microbica normale. Come si vedrà in seguito, l'efficacia non si riscontra esclusivamente nei disturbi stress-relati, ma si estende a una vasta gamma di problematiche, da quelle prettamente fisiologiche, come i disturbi gastrointestinali e metabolici, a quelle legate al neurosviluppo, come per esempio i disturbi dello spettro autistico.

Parlare di “salute intestinale” implica spesso un riferimento al probiotico come supplemento alla nostra alimentazione, con l'intenzione di migliorare il benessere del nostro intestino e, auspicabilmente, anche il nostro umore. Accanto ai probiotici, è da nominare la classe dei prebiotici: essi sono definiti come alimenti fermentati selettivamente che nutrono il microbiota, apportando cambiamenti specifici nella composizione e/o nell'attività del microbiota gastrointestinale che si traducono in benefici

nella salute dell'ospite (Gibson & Roberfroid, 1995). Si tratta in questo caso di sostanze organiche, come per esempio le fibre, che, una volta assunte, stimolano la crescita di batteri buoni nel nostro microbiota. Dalla combinazione dei probiotici e dei prebiotici nascono i prodotti simbiotici, ovvero degli alimenti con interessanti proprietà nutritive che li rendono ottimi candidati per la classificazione come ingredienti alimentari funzionali al miglioramento della salute. La fusione permette un incremento della probabilità di sopravvivenza nonché l'impianto di integratori alimentari microbici vivi nell'intestino.

In generale, si può affermare che mediante questi supplementi alimentari si attua una manipolazione della microflora al fine di aumentare il numero di batteri simbiotici che popolano l'intestino. Questo intervento ha un impatto sulla funzione immunitaria, sulla digestione, sul metabolismo e, ovviamente, sulla comunicazione bidirezionale tra intestino e cervello. I probiotici risultano quindi un supporto alla flora batterica intestinale, e garantiscono un'ulteriore protezione contro i patogeni enterici. Inoltre, essi sono conosciuti per i risultati promettenti relativamente all'aumento della funzionalità della barriera gastrointestinale, così come alla proprietà di contrastare il diabete, l'obesità, l'infiammazione, l'allergia e il cancro (Kerry et al., 2018).

La capacità dei probiotici (e dei prebiotici) di apportare un guadagno in termini di salute sia fisica che mentale ha generato fiducia ed entusiasmo, al punto che spesso si descrive l'approccio probiotico come una rivoluzione nel campo del trattamento delle problematiche che possono intaccare l'organismo. Ciò che ad oggi si sa è che l'assunzione è utile soprattutto per ristabilire l'equilibrio intestinale che ha subito una compromissione da parte di agenti quali gli antibiotici, lo stress, variazioni nella dieta o infezioni gastrointestinali (soprattutto in età pediatrica o neonatale). Ad oggi però, non siamo pronti ad affermare la piena validità dei probiotici come cura, in quanto i risultati ad ora disponibili, seppur promettenti, risentono di limiti (come la sperimentazione attuale prevalentemente preclinica) che richiedono tuttora un atteggiamento di cautela nel trarre conclusioni. Tuttavia, è sicuramente da riconoscere un effetto benefico che, con l'avanzare della ricerca, potrebbe assumere sempre più una connotazione curativa.

Capitolo 4

I fattori ambientali coinvolti nella dinamica cerebro-intestinale

La scoperta del microbiota e della sua intricata relazione con l'asse cerebro-intestinale ha indotto profondi cambiamenti nell'approccio di ricerca orientato alla conoscenza dell'uomo, del suo benessere e della sua condizione di malattia. I risultati ottenuti nel corso degli ultimi decenni hanno determinato un cambio di prospettiva che è tuttora in fase di realizzazione, soprattutto nel campo in cui si punta al microbiota come bersaglio terapeutico. I disturbi mentali e le malattie neurologiche stanno diventando un onere medico in rapido aumento, in particolar modo se si osserva l'andamento dei disturbi dello spettro autistico e dei disturbi neurodegenerativi. Sebbene siano stati condotti studi approfonditi, i progressi nello sviluppo di terapie efficaci per queste malattie sono ancora lenti. Il punto in cui la ricerca è attualmente arrivata ci ricorda che l'essere umano è un superorganismo, inteso come essere complesso e caratterizzato dall'influenza tra molteplici fattori. Di conseguenza, solo prendendo in considerazione l'organismo umano e il suo microbiota allo stesso tempo è possibile ottenere una reale comprensione dei suddetti stati di malattia.

Negli ultimi secoli, il microbiota ha subito enormi cambiamenti, molto più dei geni umani, e ciò è avvenuto a causa delle moderne trasformazioni nella dieta, nello stile di vita, nelle cure mediche e così via, parallelamente alla moderna transizione epidemiologica (Liang et al., 2018).

In generale, vi sono numerosi fattori in grado di generare un'influenza sulla dinamica cerebro-intestinale, andando ad indurre dei cambiamenti nel profilo microbico che si ripercuotono sul benessere generale dell'organismo. Tali elementi vanno analizzati entro un'ottica che contempli l'evoluzione multidimensionale che ha attraversato la società, ponendo particolare attenzione alla sua configurazione odierna. Aderire ad una prospettiva ampia è necessario, in quanto l'influenza ambientale gioca un ruolo significativamente rilevante fin dalla nascita dell'individuo, inserendosi così come

variabile che, insieme alla predisposizione genetica, funge da punto chiave nello sviluppo della persona, andando a definire la variabilità inter- e intra-individuale.

4.1 L'alimentazione e l'alcol

Riprendendo ciò che si è affrontato in precedenza (si veda il capitolo 2), si è visto come il tipo di parto rappresenta una prima influenza sul microbiota del bambino, andando a definirne l'iniziale composizione. In seguito, la modalità di nutrimento, tramite il latte materno o il latte artificiale, può indurre ulteriori modifiche e alterazioni nella microflora del neonato, con conseguenze sulla salute che si possono protrarre nel tempo. A partire dalla prima fase di vita è dunque già evidente come l'alimentazione giochi un ruolo significativo, e ciò vale per tutto il corso dell'intera esistenza.

I modelli dietetici possono modulare il microbioma intestinale attraverso l'alterazione della disponibilità di nutrienti: recenti sviluppi hanno infatti suggerito che l'intervento dietetico può avere un impatto sulla ricchezza microbica intestinale. Dall'altra, la minore ricchezza del microbioma è stata identificata come meno sana e associata a disfunzione metabolica e infiammazione di basso grado (Cryan et al., 2019). A tale proposito, diversi studi hanno indagato come le differenze nelle abitudini alimentari di popolazioni di diversa provenienza possano riflettersi in differenti profili microbici a confronto. Yatsunen et al. (2012) hanno osservato la composizione microbica intestinale di una popolazione indigena amazzonica, degli abitanti di un villaggio agricolo dello stato sudafricano del Malawi, e di una città nordamericana. Grazie all'uso della metagenomica, gli studiosi hanno potuto isolare tutti i microbi intestinali dai campioni fecali, purificare in seguito il materiale genetico (il DNA) e infine individuare tutti i geni batterici mediante una tecnica di analisi automatizzata. L'implementazione di questi approcci ha consentito la rilevazione di importanti differenze tra i gruppi analizzati, le quali sono dovute, come si può facilmente immaginare, dall'assoluta diversità di stili di vita e abitudini alimentari presenti tra contesti geografici e culturali tutt'altro che somiglianti tra loro. A discapito delle differenti caratteristiche genetiche e ambientali che amerindi e malawiani presentano, essi mostrarono però uno schema analogo di microbi nell'intestino, dovuto in entrambi i casi a un regime alimentare che predilige prodotti vegetali ed è povera di prodotti animali. Da questa alimentazione deriva una composizione microbica ben più ricca di quella rilevata nei nordamericani, abituati invece

ad una dieta bilanciata in maniera opposta. Il largo consumo di prodotti animali affiancato da un'assunzione povera di vegetali è stato associato ad una riduzione fino a un terzo della diversità microbica intestinale, la quale è a sua volta associata negativamente alla resistenza contro le infezioni, gli antibiotici, le sostanze carcinogeniche e lo stress cronico, così come alla disponibilità di una riserva variabile di elementi nutritivi. Oltre alle rilevanti differenze riscontrate, gli studiosi evidenziarono anche che queste possono essere individuate già durante i primi tre anni di vita, quando lo stile di vita degli adulti gioca il proprio ruolo attraverso la tipologia di allattamento.

La dieta occidentale prevede un'alimentazione ricca di zucchero, sale e/o grassi, ed è stata ampiamente considerata come uno dei principali fattori che contribuiscono all'insorgenza di disordini metabolici e condizioni patologiche associate. Gli individui che la seguono condividono un profilo del microbiota intestinale simile a quello che si osserva negli individui obesi (Cryan et al., 2019). Grazie agli esperimenti su animali, è ormai evidente come una dieta regolare ricca di grassi può rendere deficitaria la risposta della sazietà a livello intestinale e cerebrale, riducendo così la capacità di percepire la sensazione di essere sufficientemente sazi. Quando si segue una dieta ricca di grassi, in particolar modo se mantenuta a lungo termine, si può scatenare uno stato di infiammazione a bassa intensità, definita anche endotossemia metabolica. Ciò avviene poiché un pasto ad alto contenuto di grassi ha il potere di determinare la diffusione di molecole infiammatorie nell'intestino, che generano così l'attivazione del sistema immunitario; a questo evento segue l'attivazione del sistema immunitario cerebrale, con la successiva produzione di molecole infiammatorie, le quali hanno come bersaglio le cellule nervose. Nell'ipotalamo questa catena di reazioni ha un effetto importante sul nostro comportamento alimentare: il centro regolatore dell'appetito diviene meno reattivo ai segnali di sazietà che seguono l'assunzione di cibo. In altre parole, nel lungo termine la percezione della sazietà necessita di pasti più abbondanti per essere esperita (Mayer, 2016).

A sostegno di queste affermazioni, si cita lo studio di Vijay-Kumar et al. (2010) che ha fornito ulteriore evidenza del ruolo centrale dei microbi enterici nell'infiammazione scatenata da una dieta ricca di grassi. Gli autori rimossero geneticamente una classe di recettori implicati nella risposta immunitaria innata nei ratti. Una volta effettuata questa operazione, gli animali divennero presto obesi e svilupparono le caratteristiche della sindrome metabolica. L'aumento consistente del peso è stato

spiegato come conseguenza dell'appetito vorace e di un difetto nel sistema deputato alla sazietà. In seguito, i ricercatori analizzarono il microbiota dei ratti, che si rivelò essere diverso da quello dei ratti che non avevano subito la mutazione genetica. A questo punto, utilizzarono la tecnica del trapianto fecale nei ratti normali, e osservarono che anch'essi iniziarono a mangiare senza limiti, divenendo presto obesi.

Da queste evidenze risulta dunque sempre più chiaro come aderire ad un piano alimentare adeguato, più vicino alla nostra dieta mediterranea, possa apportare degli importanti benefici al nostro organismo. D'altronde, il cibo rappresenta il miglior psicobiotico che abbiamo a nostra disposizione, per cui è essenziale prestare attenzione alla nostra alimentazione.

Il microbiota intestinale gode della capacità di adattarsi rapidamente alle modifiche introdotte nella nostra abitudine alimentare, ma è necessario sottolineare che l'esposizione a una determinata dieta nelle prime fasi di vita, così come il mantenimento di determinate abitudini alimentari per generazioni, potrebbero avere un peso significativo nella determinazione del profilo microbico. A proposito di questo, alcuni studi tendono a smorzare l'ottimismo relativo all'ottica che vede il cambiamento delle proprie abitudini come strumento per ottimizzare la salute intestinale. Infatti, si è visto che l'introduzione di un cambiamento nella propria dieta, come può essere seguire una dieta vegana per un determinato periodo di tempo, apporta modificazioni temporanee e rilevabili principalmente a livello dei metaboliti microbici. Nello studio di Wu et al. (2010) è stato dimostrato che l'alimentazione modifica la produzione di metaboliti dei soggetti onnivori e vegani coinvolti nell'esperimento, senza tuttavia apportare cambiamenti significativi nella composizione dei microbi che li producono. In altre parole, si può concludere che nascere in una civiltà implica molto probabilmente anche acquisirne il microbioma caratteristico, con la diretta conseguenza che il cambiamento della propria dieta può determinare delle modifiche esclusivamente a livello metabolico. Da questa conclusione non è opportuno dedurre che non è possibile migliorare la propria salute intestinale, ma piuttosto si evince come il bersaglio degli interventi alimentari non sia tanto il microbiota, quanto piuttosto i metaboliti circolanti nel nostro organismo.

Alla dieta occidentale e alle problematiche connesse che sono state sviscerate, si contrappone la dieta mediterranea, caratterizzata principalmente dal consumo di cereali, noci, legumi, verdure e frutta con un consumo moderato di pollame e pesce. Ad essa, così

come alla dieta occidentale, sono associate determinate caratteristiche distintive e identificabili del microbiota intestinale. Studi di intervento sull'uomo hanno dimostrato che il consumo di una dieta mediterranea può ridurre drasticamente l'incidenza di disturbi neurodegenerativi, condizioni psichiatriche, cancro e malattie cardiovascolari. È interessante, inoltre, che in numerosi studi è stato dimostrato che la dieta mediterranea correla con un ridotto rischio di depressione (Cryan et al., 2019).

Come si è appena analizzato, una dieta caratterizzata dal consumo eccessivo di grassi e zuccheri può contribuire invece all'alterazione del microbiota intestinale, e può concorrere nell'insorgenza di malattie epatiche e obesità, così come celiachia, malattia infiammatoria intestinale, sindrome dell'intestino irritabile, diabete di tipo 1 e 2, allergie alimentari e problemi cardiovascolari, soprattutto negli individui geneticamente a rischio (Engen et al., 2015).

Oltre all'assunzione di grassi e zuccheri, anche il consumo di alcol può determinare uno stato di disbiosi intestinale, andando ad intaccare il benessere e la diversità del microbiota. Se da un lato numerose evidenze sostengono che il consumo occasionale, moderato e attento di alcol sia benefico per la salute, dall'altro un consumo eccessivo può scatenare una serie di conseguenze negative sull'organismo, che si ripercuotono anche a livello intestinale. Ciò assume importanza se si considera il tasso di consumo nella popolazione, così come la comorbilità che spesso si riscontra nei pazienti con depressione o con altri disturbi psicologici che prevedono l'uso di psicofarmaci che, in interazione con l'alcol, possono avere importanti reazioni (Anderson et al., 2017).

È stato più volte dimostrato che l'alcol produce un triplice effetto a livello gastrointestinale: mentre provoca uno stato di disbiosi, stimola un'iperproduzione di batteri e riduce la funzionalità della barriera intestinale. Questi fattori sono stati associati all'insorgenza e alla progressione di diversi disturbi epatici alcol-relati. Ciò avviene in quanto l'alcol induce una condizione di stress ossidativo nell'intestino, che determina la decomposizione delle giunzioni strette della barriera gastrointestinale e provoca un aumento anomalo della sua permeabilità. Questo stato consente ai prodotti patogeni e pro-infiammatori presenti nell'intestino di traslocare nel fegato, in cui causano dunque un'infiammazione. Questa traslocazione di prodotti batterici durante la crescita eccessiva batterica o la disbiosi indotta dall'alcol può contribuire in modo significativo alla malattia

epatica allo stadio terminale, andando a indurre un'infezione che aumenta il rischio di mortalità (Engen et al., 2015).

4.2 L'esposizione alle sostanze chimiche e ai farmaci

L'ambiente in cui viviamo ha forse uno dei maggiori impatti nel plasmare le differenze interculturali riscontrate nei parametri di salute e nella composizione del microbiota. Ad esempio, è stato dimostrato che diverse componenti del microbiota intestinale sono coinvolte nel metabolizzare più di quaranta diverse sostanze chimiche ambientali. Dall'altra, le sostanze in questione modulano anche la composizione del microbiota intestinale, con la possibilità dunque di avere effetti sul cervello e sul comportamento attraverso l'asse microbiota-intestino-cervello. Si è visto che l'esposizione a metalli pesanti (come mercurio, cadmio, arsenico e piombo) è altamente nociva per l'organismo, con possibili effetti cancerogeni e ripercussioni sul sistema immunitario. Inoltre, è stata rilevata un'alterazione della composizione del microbiota enterico conseguentemente alla vicinanza con ambienti contaminati da metalli pesanti (Cryan et al., 2019).

Accanto alle sostanze ambientali, si aggiunge l'atteggiamento verso la propria salute come possibile variabile che ha la potenzialità di interferire con il profilo microbico. L'avvento della modernizzazione ha determinato un miglioramento delle condizioni sanitarie; tuttavia, il trattamento e l'igiene eccessiva hanno causato una perturbazione del microbiota commensale. Sia l'uso dei farmaci che quello degli antibiotici sono senza dubbio aumentati nel corso degli anni, ma solo recentemente è stato rivolto uno sguardo attento al costo che un antibiotico esercita sulla salute di un individuo attraverso il danno collaterale del farmaco sul nostro microbiota. La preoccupazione nasce dall'attacco indiscriminato che scaturisce dall'assunzione di un antibiotico, a cui segue un impoverimento generale della microflora intestinale con la seguente esposizione a svariate problematiche (Anderson et al., 2017). In particolare, la manifestazione più importante si rileva nei confronti di un neonato o di un bambino durante i primi anni di vita, una fase in cui il profilo microbico è nel pieno della propria formazione e definizione. Paradossalmente, i primi due anni di vita sembrano essere il periodo in cui l'uso di antibiotici manifesta la sua massima intensità (Blaser, 2016).

Anche la polifarmacia, ovvero l'uso simultaneo di più farmaci da parte di un paziente, è stata associata a cambiamenti del microbiota intestinale. Diversi studi hanno

indagato l'azione di farmaci non antibiotici sulla microflora enterica e hanno individuato un'attività antimicrobica spesso considerevole. A tale proposito, negli ultimi anni la ricerca si è interessata ai farmaci psicotropi e ai possibili effetti collaterali, con il riscontro che diverse classi determinano un effetto anti-commensale, tra cui risaltano antidepressivi e antipsicotici. In vista dell'influenza rilevata, è importante considerare la probabilità che il meccanismo d'azione di questi farmaci coinvolga l'azione batterica (Cryan et al., 2019).

4.3 L'esercizio fisico

Accanto ai fattori finora presi in analisi, anche le abitudini che caratterizzano la quotidianità hanno un ruolo determinante sulla salute, inclusa quella intestinale. Oltre alla dieta, vi sono poche altre variabili ambientali caratteristiche dello stile di vita moderno che esercitano un tale livello di controllo a livello fisiologico; tra queste, è sicuramente da nominare l'esercizio fisico. Sebbene allo stato attuale sia tuttalpiù sconosciuto il suo impatto sulla relazione tra intestino e cervello, la ricerca sta espandendo il suo interesse a tale rapporto, giungendo a risultati interessanti (si veda la Figura 7 per una panoramica).

Denominatore spesso comune in molti studi è la rilevazione di un aumento della diversità microbica come conseguenza dello svolgimento di esercizio fisico. Si è infatti visto che l'esercizio, in particolar modo quello aerobico moderato, ha un impatto positivo sull'intestino, espresso sia nel miglioramento della diversità del microbioma, sia nel metabolismo funzionale. Ciò che è stato più volte evidente è che l'esercizio fisico sembra potersi configurare come una potenziale influenza esterna capace di alterare la biodiversità intestinale in modo sia quantitativo che qualitativo. L'alterazione dei profili batterici e l'influenza sui prodotti dei batteri intestinali ha il potenziale effetto di invertire le condizioni associate all'obesità, alle malattie metaboliche, alla cattiva alimentazione, insieme a disturbi neurali e comportamentali (Dalton et al., 2019).

Ad oggi, l'elenco dei benefici legati alla salute è in continua espansione, andando a toccare una vasta serie di condizioni per le quali il movimento si è dimostrato essere un supporto e un fattore protettivo: la limitazione del deterioramento cognitivo correlato all'età, la prevenzione del cancro al colon, il trattamento del diabete, la sindrome dell'intestino irritabile e la depressione. Di fatto, il microbiota e le interazioni immunitarie e metaboliche dieta-microbo-ospite sono state implicate nell'eziopatogenesi di tutte queste problematiche (O'Sullivan et al., 2015).

In merito all'anziano, è risaputo e spesso affermato il notevole beneficio che l'esercizio apporta, esprimendosi sul piano cognitivo, psicologico e fisico. Riguardo alla salute intestinale, è stato dimostrato che la fragilità e la ridotta capacità di esercizio negli anziani sono legate a una bassa diversità microbica fecale, la quale correla con una scarsa diversità alimentare. A proposito delle ripercussioni a livello cerebrale invece, si è visto che quantità moderate di esercizio possono fare una differenza significativa per le strutture e la loro funzione; ad esempio, nei roditori è stato dimostrato che l'esercizio volontario ha un impatto sul tasso di neurogenesi. Inoltre, vi sono evidenze anche a sostegno della capacità di superare l'esaurimento dipendente dall'età della neurogenesi ipocampale, offrendo un potenziale per l'inversione dell'invecchiamento cerebrale (Cryan et al., 2019). L'esercizio aerobico, se svolto in modo regolare e a intensità moderata, previene la perdita di volume cerebrale legata all'età e promuove l'aumento del volume cerebrale nelle aree deputate alla cognizione, al controllo dell'attenzione e della memoria. I benefici positivi dell'esercizio sulla funzione neurale sembrano essere mediati dalla regolazione del BDNF, un fattore chiave nella crescita e nella sopravvivenza dei neuroni striatali e fondamentale nella regolazione dei disturbi dell'umore, accanto all'apprendimento e alla memoria (Cryan & O'Mahony, 2011; Dalton et al., 2019).

In aggiunta agli effetti collegati allo svolgimento di esercizio fisico a livello intestinale e cerebrale, la sperimentazione animale ha rilevato una maggiore stimolazione della produzione di butirato, un SCFA prodotto come metabolita batterico. Esso ha la capacità di aumentare la quantità di cellule epiteliali, regolare il sistema immunitario e promuovere l'integrità della barriera intestinale (Mailing et al., 2019; Dalton et al., 2019).

Per finire, è interessante rivolgere l'attenzione alle evidenze riguardanti la prescrizione di esercizio fisico nel trattamento di coloro che soffrono di SII. Per i pazienti sono state sviluppate terapie di esercizio mirato, a cui è seguito un miglioramento non solo nei sintomi puramente fisiologici del disturbo, ma anche in quelli legati alla sfera mentale ed emotiva. L'evidenza suggerisce che la diversità batterica dell'intestino contribuisce allo stato disordinato dei disturbi gastrointestinali influenzando negativamente sia la funzione gastrointestinale, sia lo stato psicologico. Si è visto che l'uso di integratori probiotici al fine di alterare il microbioma migliora l'integrità gastrointestinale, così come anche l'umore dei pazienti con SII (Dalton et al., 2019).

È dunque evidente che il profilo microbico intestinale, in particolare la sua diversità, potrebbe avere un ruolo chiave in questa come in altre condizioni di malattia organica e psicologica, e come l'esercizio fisico potrebbe avere la capacità di apportare dei benefici agendo anche tramite la microflora intestinale.

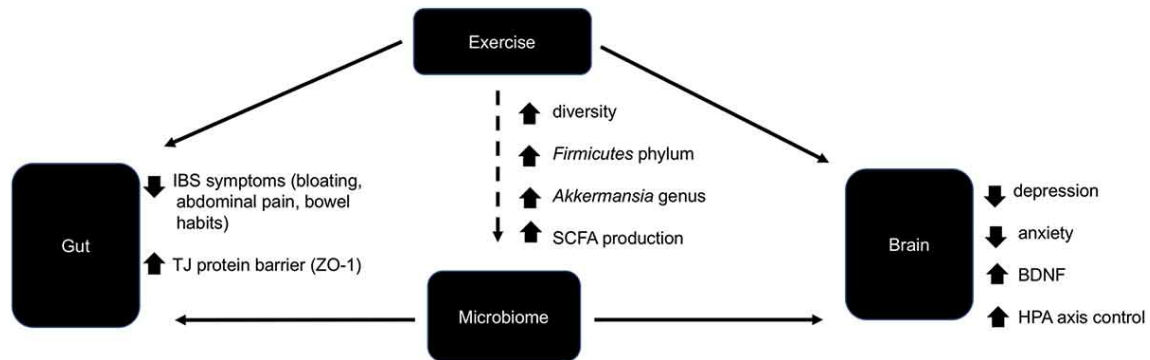


Figura 7: L'impatto dell'esercizio fisico sull'asse microbiota-intestino-cervello. L'esercizio fisico e il microbioma intestinale hanno dimostrato in modo indipendente di migliorare i sintomi della SII e stabilizzare la barriera intestinale, ridurre i disturbi psicologici (ad esempio depressione, ansia), promuovere la neurogenesi (attraverso BDNF) e migliorare il controllo dell'asse HPA. È stato dimostrato che l'esercizio moderato causa una maggiore diversità nel microbioma, in particolare nei ceppi Firmicutes e Akkermansia. Rispettivamente, si è visto che i primi producono SCFA, mentre i secondi sono collegati a malattie metaboliche e neurali. La misura in cui l'effetto dell'esercizio sull'intestino e sul cervello è mediato da alterazioni nel microbioma è sconosciuta, di conseguenza gli autori hanno preferito utilizzare una linea tratteggiata a rappresentare la proposta di un possibile meccanismo. Le linee continue rappresentano invece meccanismi noti. Abbreviazioni: BDNF, fattore neurotrofico derivato dal cervello; SCFA, acidi grassi a catena corta; ZO-1, proteina zona occluden-1; asse HPA, asse ipotalamo-ipofisi-surrene; TJ, giunzione stretta (Dalton et al., 2019).

4.4 I ritmi circadiani

I ritmi circadiani sono schemi ritmici presenti nella maggior parte degli organismi, la cui funzione è quella di sincronizzare importanti attività fisiologiche ad ogni livello di organizzazione nel corpo, dai tempi di riposo-veglia ai processi metabolici a livello cellulare. L'orologio circadiano dei mammiferi segue un ciclo di feedback di circa ventiquattro ore, in cui si verifica un continuo adattamento fisiologico in una vasta varietà di processi, quali per esempio quelli di trascrizione e traduzione cellulare, la funzione gastrointestinale e metabolica. L'orologio biologico endogeno, sebbene si basi sull'orologio circadiano molecolare e funzioni di per sé in maniera indipendente dall'ambiente, risente dell'influenza dei segnali esterni. In realtà, la capacità di rispondere e adattarsi ai cambiamenti dell'ambiente è vitale per la sopravvivenza; dunque, ciò che avviene è una continua sincronizzazione dell'orologio circadiano sulla base della

captazione di segnali ambientali come la luce, il momento in cui ci si alimenta, il tipo di cibo che si assume, l'esercizio fisico, la temperatura e l'eventuale stato di infezione.

La considerazione costante di ciò che viene captato dall'esterno è fondamentale per un'ulteriore ragione: vista la durata variabile dell'orologio circadiano molecolare, è necessario un suo costante aggiustamento, anche in questo caso al fine di sincronizzarsi con l'ambiente. Un'influenza rilevante deriva inevitabilmente dalle attuali aspettative sociali, le quali hanno di frequente impatti ambientali negativi sul ritmo circadiano; tra questi vi sono il jet lag, il lavoro a turni, il jet lag sociale (inteso come l'influenza sui ritmi operata dagli impegni scolastici, lavorativi e sociali), l'esposizione alla luce, l'alimentazione notturna, i tempi di alimentazione incoerenti e una dieta ricca di grassi (Voight et al., 2016; Teichman et al., 2020).

I cicli di alternanza luce/buio sono importanti regolatori dell'orologio circadiano centrale dei mammiferi situato nel nucleo soprachiasmatico (SCN). Esso consta di un gruppo definito di cellule situato nell'ipotalamo, che svolgono due funzioni essenziali: integrano gli ingressi provenienti dal nervo ottico e sincronizzano i ritmi circadiani nella periferia attraverso segnali simpatici e parasimpatici. In altre parole, l'SCN funge da pacemaker circadiano, ovvero la parte dell'organismo che detta il ritmo (Voigt et al., 2016).

In merito alla relazione tra i ritmi circadiani e l'asse microbiota-intestino-cervello, sono stati ottenuti dati promettenti negli ultimi anni, in particolare nello studio della loro influenza combinata sulla salute fisica e mentale. Tuttavia, anche in questo ambito sono necessarie ulteriori ricerche per esaminare come si fondono per modulare la gravità e il rischio di alcune malattie. Uno dei fattori comuni individuati nelle patologie caratterizzate dalla disregolazione dei ritmi circadiani è l'essere state scatenate o promosse da processi infiammatori. Ovviamente, l'intestino è la parte dell'organismo maggiormente esposta all'infiammazione. Nel corso degli anni diversi studi hanno dimostrato che anche l'intestino è soggetto a fluttuazioni circadiane, determinate dal momento dedicato all'alimentazione e dal tipo di dieta seguita. In poche parole, mentre l'alternanza ciclica luce/buio è il regolatore che detta il tempo all'orologio circadiano centrale, le variabili legate all'alimentazione sono il regolatore dell'orologio circadiano del microbiota intestinale (Figura 8). A tale proposito, si è visto che la composizione del microbiota intestinale è soggetta a variazioni diurne ed è influenzata dai ritmi circadiani dell'ospite.

A sua volta, un microbiota diversificato è essenziale per la regolazione ottimale delle vie circadiane (Voigt et al., 2016).

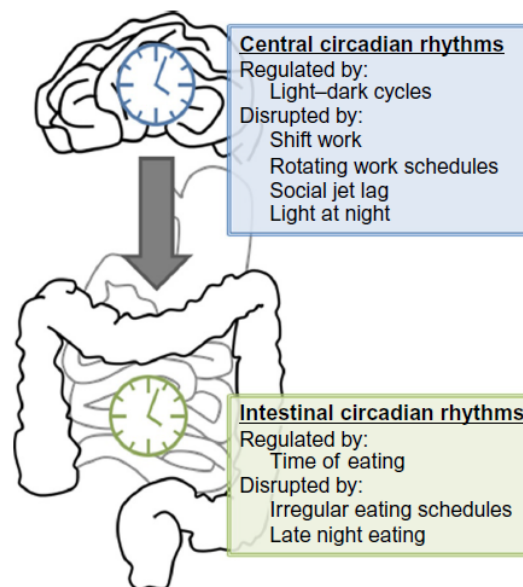


Figura 8: L'orologio circadiano centrale e periferico. I ritmi circadiani intestinali subiscono l'influenza dettata dai ritmi imposti dal nucleo soprachiasmatico e, al contempo, variano in funzione dell'alimentazione, del momento ad essa dedicato, e delle cattive abitudini alimentari. Effettuare i pasti ad orari notturni, nutrirsi in maniera irregolare, aderire ad una dieta sbilanciata o ricca di grassi, hanno il potere di alterare il ritmo circadiano enterico (Voigt et al., 2016).

Un interessante studio ha dimostrato che più del 20% dei batteri intestinali rivela fluttuazioni durante il giorno, sia in termini di abbondanza sia di attività. Inoltre, gli stessi autori hanno trapiantato in topi GF il microbiota intestinale di uomini esposti al jet lag, e hanno rilevato un trasferimento che si è tradotto nell'obesità e nell'intolleranza al glucosio; dato curioso è che questi effetti non sono stati osservati in seguito a trapianto da uomini non esposti al jet lag (Thaiss et al., 2014). Questi risultati forniscono un'evidenza di come alcuni disturbi metabolici riscontrati negli individui con ritmi circadiani alterati (per esempio i turnisti o coloro che prendono di frequente voli aerei) siano dipendenti dal microbioma enterico.

4.4.1 I disturbi psichiatrici e neurodegenerativi tra ritmo circadiano e microbiota

Diversi ricercatori hanno studiato la relazione tra i ritmi circadiani e i disturbi psichiatrici, concentrandosi in particolare sul disturbo depressivo maggiore, sulla schizofrenia, il disturbo bipolare e i disturbi d'ansia. Alterazioni del ritmo circadiano (causate da fattori

come il lavoro a turni, il possesso di un cronotipo serale o un ritardo di fase nell'insorgenza del ritmo) sono stati tutti associati ad una maggiore prevalenza o gravità della depressione maggiore. Accanto a queste osservazioni, ve ne sono altre che coinvolgono il microbiota intestinale: come si vedrà in seguito, esso risulta evidentemente alterato nei pazienti con disturbo depressivo, mostrando differenze significative rispetto al microbiota dei controlli sani. Inoltre, l'assunzione di antibiotici, prebiotici o probiotici determina effetti simil-antidepressivi e ansiolitici nei modelli animali, dimostrando che l'alterazione indotta nella microflora intestinale si ripercuote apportando benefici all'umore.

Anche nei disturbi neurodegenerativi è rintracciabile una regolarità alterata dei ritmi circadiani che si esprime con sintomi specifici. Le persone più anziane con diagnosi di demenza o malattia di Alzheimer soffrono spesso della cosiddetta *sundowning syndrome*: essa consiste nel peggioramento della sintomatologia al tramontare del sole, caratterizzato da manifestazioni di declino cognitivo, incremento dello stato confusionale e dell'agitazione. In questi pazienti sono stati rilevati livelli più bassi di melatonina, deficit localizzati al SCN e alterazioni all'asse HPA. Inoltre, a livello del microbiota è stata trovata un'alterazione espressa in un'abbondanza di batteri pro-infiammatori e una diminuzione dei batteri antinfiammatori (Teichman et al., 2020).

Nell'anziano è inoltre rilevante il rischio di insorgenza del disturbo di Parkinson, la cui manifestazione è preceduta dal disturbo comportamentale del sonno REM idiopatico (*Rapid eye movement sleep Behavior Disorder*, RBD). Esso consiste nella mancanza della fisiologica atonia muscolare che si verifica durante la fase di sonno REM. È interessante notare che il microbiota intestinale dei pazienti con RBD è molto simile a quello dei pazienti con disturbo di Parkinson, ed entrambi mostrano differenze significative rispetto al profilo microbico dei controlli sani (Heintz-Buschart et al., 2018; Teichman et al., 2020).

Benché la ricerca rivolta ad indagare la relazione tra i ritmi circadiani e il microbiota intestinale sia, come è evidente, ancora agli inizi, sono crescenti le evidenze che supportano non solo un'interazione, ma una comunicazione reciproca e bidirezionale tra i due. La sua osservazione è ad oggi lontana dall'essere rilevabile nei disturbi psichiatrici e neurodegenerativi, ma è sicuramente più manifesta nei disturbi metabolici, come l'obesità, il diabete e i disturbi cardiovascolari.

Capitolo 5

Il coinvolgimento dell'asse nei disturbi del SNC

La prevalenza di disturbi mentali, delle malattie neurologiche e del neurosviluppo è in costante aumento, procedendo in parallelo con i cambiamenti nel microbiota commensale umano. Nel frattempo, lo studio del coinvolgimento dei batteri intestinali nell'eziologia e nella patofisiologia di queste manifestazioni si fa sempre più approfondito, con evidenze eterogenee tra i disturbi. Infatti, lo stato dell'evidenza varia notevolmente tra di essi: per alcuni si sta attraversando una fase preliminare di ricerca in cui gli studi sono stati limitati alle osservazioni correlazionali dell'alterata composizione microbiotica nelle popolazioni cliniche, mentre è stato evidenziato un supporto più forte nei confronti della possibilità che il microbiota svolga un ruolo causale in altri processi patologici. In parallelo, le terapie mirate al microbiota hanno guadagnato sempre più attenzione. Ad oggi, la potenzialità intrinseca al trattamento tramite probiotici, prebiotici e FMT è in costante aumento.

Nel corso del capitolo verranno affrontati i disturbi in cui l'influenza della flora batterica intestinale ha riscosso maggior riscontro.

5.1 I disturbi dello spettro autistico

I disturbi dello spettro autistico (DSA) sono un insieme eterogeneo di condizioni del neurosviluppo che si manifestano con “deficit persistenti nella comunicazione e nell'interazione sociale e con pattern di comportamento, interessi o attività ristretti e ripetitivi” (DSM-5, 2013). In aggiunta a questi sintomi comportamentali, si manifestano spesso gravi comorbidità negli individui che ne soffrono, tra cui ansia, disturbi del sonno, convulsioni e problemi metabolici. La sintomatologia è spiegata da profonde alterazioni nei processi fisiologici centrali come la neuroinfiammazione, la neurotrasmissione, la neurogenesi e la produzione di ormoni prosociali, come l'ossitocina e la vasopressina.

Ad oggi, l'eziologia dei DSA è ancora sconosciuta, ma si ritiene probabile che le cause possano includere fattori di rischio genetico e ambientale. Di conseguenza, le terapie di trattamento dei sintomi sono attualmente limitate, per cui la ricerca è spinta anche dall'esigenza di individuare una cura efficace. Un primo e importante passo in questa direzione è avvenuto grazie allo studio dei sintomi gastrointestinali (GI) presenti in comorbidità con quelli comportamentali. Le problematiche in questione spesso includono diarrea o costipazione, dolore addominale e reflusso gastrico; non è raro che la contrazione di questi sintomi soddisfi i criteri diagnostici per la sindrome dell'intestino irritabile. È stato rilevato che la prevalenza dei disturbi GI varia dal 23% al 70% nei bambini con DSA. Inoltre, è stata rilevata una correlazione positiva tra la gravità dei sintomi comportamentali e gastrointestinali, che suggerisce un legame tra l'intestino e il cervello nel neurosviluppo. (Mayer et al., 2014a; Borre et al., 2014b; Morais et al., 2021).

In particolare, lo studio di Chaidez et al. (2014) ha analizzato un vasto campione composto da bambini con autismo, ritardo nello sviluppo o sviluppo tipico, giungendo a due risultati interessanti: primo, la frequenza dei sintomi GI era più elevata nel gruppo di bambini con diagnosi di DSA rispetto a coloro che appartenevano alle altre due condizioni; secondo, coloro che soffrivano di questi disagi (DSA o ritardo nello sviluppo) ottennero punteggi peggiori nei parametri dell'irritabilità, del ritiro sociale, della stereotipia e dell'iperattività rispetto ai bambini con sviluppo tipico.

Sebbene questa categoria di disturbi venga classicamente pensata come principalmente "neurologica" nella sua manifestazione patologica, è in rapida crescita il numero di prove che dimostra un ruolo significativo del sistema gastrointestinale e del suo microbioma negli aspetti strettamente appartenenti alla sintomatologia dei DSA. Pertanto, è in continua discussione la natura eziologica sottostante a questi disturbi, e negli ultimi anni l'attenzione è stata rivolta in particolar modo al microbiota intestinale.

Insieme ai disturbi gastrointestinali sono stati riportati segni di disfunzione del sistema immunitario, così come anche un aumento della permeabilità intestinale. Questa associazione di sintomi ha incoraggiato ulteriormente l'esplorazione del microbiota negli individui con DSA, soprattutto in virtù di significative differenze relative alla composizione microbica; tuttavia, nonostante siano numerose le segnalazioni di disbiosi, c'è poco consenso sulle specie batteriche specifiche che sono alterate in modo simile in studi separati. Cioè, non è stata identificata alcuna firma microbica definita per

i DSA, sebbene molti studi riportino differenze del microbioma all'interno di coorti indipendenti di individui con DSA e soggetti di controllo (Li et al., 2017; Vuong & Hsiao, 2017; Cryan et al., 2019; Morais et al., 2021).

Gli studi più numerosi hanno ovviamente utilizzato modelli animali per indagare la patogenesi dei disturbi dello spettro autistico e il coinvolgimento dei microrganismi nella sua realizzazione. Gli approcci prevalentemente usati prevedono il confronto della composizione del microbiota intestinale tra il campione di interesse e i controlli sani, oppure l'osservazione dei cambiamenti comportamentali in seguito alla somministrazione di modulatori del microbiota intestinale nei soggetti affetti o, ancora, di fattori di virulenza nei controlli.

La ricerca relativa ai meccanismi coinvolti nell'eziologia dei DSA deve tenere in considerazione alcune peculiarità tipiche dei bambini che ne sono affetti, in quanto possono determinare da sé un'alterazione intestinale che obbliga gli studiosi ad approcciarsi con cautela ai risultati ottenuti nelle indagini condotte. Innanzitutto, si fa riferimento all'uso spesso frequente di antibiotici da parte dei bambini con disturbi del neurosviluppo, e alle restrizioni alimentari che spesso caratterizzano la loro dieta. I soggetti con autismo in particolare tendono a aderire ad un'alimentazione limitata, dettata da preferenze selettive che possono, soprattutto se mantenute a lungo termine, determinare una scarsa diversità nell'assunzione di nutrienti che può tradursi, a sua volta, nell'alterazione nella composizione microbica. Alla luce di tutto ciò, è essenziale che l'osservazione del microbiota intestinale in individui con questo tipo di diagnosi tenga in considerazione le possibili variabili confondenti che possono concorrere nel determinare un'alterazione della microflora.

In uno dei migliori e più autorevoli studi realizzati in questo ambito, Hsiao et al. (2013) si sono chiesti se la modellizzazione delle caratteristiche comportamentali tipiche del DSA nei topi causasse disfunzioni gastrointestinali. Per rispondere al quesito, i ricercatori si sono serviti dell'attivazione immunitaria materna (MIA): essa si basa sull'induzione di un'infezione virale in cavie incinte al fine di osservare nella prole i risultati dell'infiammazione indotta. Alla nascita, i topi mostrarono una gamma di comportamenti alterati, simili a quelli manifestati dagli individui affetti da DSA: si rilevò una condotta ansiosa o ripetitiva e stereotipata, nonché una compromissione delle interazioni sociali. L'osservazione di questi aspetti disfunzionali del comportamento riscontrati in seguito

all'attivazione immunitaria materna permette di considerare quest'ultima un valido modello animale per l'autismo. Oltre alle suddette evidenze, i ricercatori individuarono modifiche nell'intestino e nel relativo microbiota delle cavie appena nate: il microbiota commensale mostrava una composizione disequilibrata e simile a quella che si rileva nell'uomo con DSA, la barriera intestinale era più permeabile e il sistema immunitario era iperattivo. La *leaky gut* misurata rimase evidente anche dopo tre anni, il che indica che le anomalie intestinali si esprimono e stabilizzano nei primi anni di vita. Venne inoltre individuato un particolare metabolita microbico che si vide essere strettamente collegato a un altro presente nelle urine di bambini affetti da autismo. Questa scoperta spinse gli sperimentatori a studiare gli effetti del trasferimento del metabolita in questione in topi sani nati da madri con sistema immunitario non attivato: le cavie espressero le medesime anomalie comportamentali osservate nella prole di madri attivate. Forse più interessante, è che le stesse osservazioni vennero fatte in seguito all'immissione del metabolita in cavie prime di germi. Il risultato più importante dello studio, anche da un punto di vista terapeutico, è quello ottenuto dalla somministrazione di batteri intestinali umani chiamati *Bacteroides fragilis*: nei topi MIA si notò una correzione della permeabilità intestinale, dell'attivazione immunitaria e, in maniera parziale, anche del comportamento anomalo (come illustrato nella Figura 9).

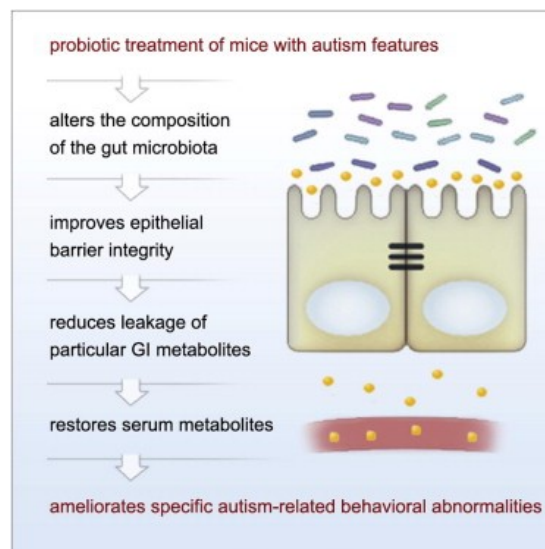


Figura 9: Gli effetti benefici della somministrazione del probiotico *Bacteroides fragilis* in topi che presentavano anomalie GI, immunitarie e comportamentali simili a quelle che colpiscono gli individui con autismo. L'alterazione della composizione del microbiota insieme al ripristino dell'efficienza della barriera intestinale e dei metaboliti gastrointestinali permette un miglioramento anche degli aspetti comportamentali autismo-relati (Hsiao et al., 2013).

Gli esiti dello studio, in particolare quello relativo al miglioramento comportamentale, suscitarono molta attenzione ed entusiasmo non solo nella comunità scientifica, ma anche nelle aziende pronte all'introduzione di nuove proposte di cura per i disturbi come l'autismo.

Lo studio della comorbilità gastrointestinale nei DSA è stato complicato dal fatto che i sintomi inerenti abitudini intestinali alterate (riferito notoriamente inaffidabile, anche quando ottenuto da pazienti senza compromissione della comunicazione), sono generalmente conosciuti indirettamente attraverso i genitori.

Sulla base dell'osservazione di un aumento della prevalenza di ansia in oltre il 40% di bambini con DSA, è stato proposto un modello che collega i sintomi ansiosi con il tratto altamente prevalente di iper-responsività sensoriale. Sia nei DSA che nei disturbi gastrointestinali funzionali, insieme all'anomalia comportamentale si rilevano alterazioni nelle regioni preposte alla regolazione sensoriale ed emotiva. Sebbene non si escluda che vi siano meccanismi alternativi con un ruolo nella fisiopatologia dei sintomi gastrointestinali nei DSA, si può ipotizzare che alcuni fra questi disagi siano la conseguenza di un'amplificazione sensoriale centrale. È possibile, dunque, che sintomi comuni di DSA come la sazietà precoce, il senso di gonfiore e la stitichezza riflettano una disfunzione percettiva, piuttosto che una disfunzione primaria del tratto gastrointestinale. Secondo un modello "cervello-centrico" come questo, in cui le alterazioni dell'intestino sono spiegate da un'iperattivazione di reti cerebrali, l'attività disfunzionale del sistema nervoso autonomo associata all'ansia e la maggiore reattività allo stress potrebbero svolgere un ruolo nella compromissione della permeabilità della barriera intestinale nei modelli animali e negli individui con DSA (Mayer et al., 2014a).

In questa concettualizzazione, sebbene sia ad oggi solamente una possibile spiegazione dei sintomi sofferti dai bambini con DSA, viene rimarcata ancora una volta la stretta relazione tra cervello e intestino, evidenziando come vi sia una dipendenza imprescindibile fra i due.

Uno degli aspetti più interessanti dello studio del coinvolgimento del microbioma intestinale nel comportamento è legato alla socievolezza, la cui espressione risulta spesso deficitaria nei casi di DSA. Alcune ricerche sugli animali risaltano il ruolo chiave dei batteri dell'intestino nel determinare un comportamento prosociale e un atteggiamento socievole (Borre et al., 2014b; Desbonnet et al., 2014). L'utilizzo di topi privi di germi

ha spesso consentito un'individuazione più limpida e chiara dell'azione del microbiota nell'asse cerebro-intestinale, sebbene vi siano, come già affrontato, delle evidenti limitazioni sulla trasposizione delle osservazioni dall'animale all'uomo.

Nello studio di Desbonnet et al. (2014) sono stati esaminati gli effetti delle condizioni di allevamento GF nel corso della prima infanzia e nell'adolescenza sul comportamento sociale rilevato in età adulta. Alla base di ricerche come questa vi è l'osservazione che i topi, come gli umani, sono una specie che ricerca il contatto sociale e ha una naturale propensione a ricercare sicurezza e piacere all'esterno. Per studiare le modifiche inerenti alla socievolezza, è stato utilizzato il *Three-Chamber Sociability and Social Novelty Test*, uno strumento che valuta la cognizione nei roditori in qualità di modelli dei disturbi del SNC. Sulla base della naturale tendenza del topo alla socialità, si osserva la direzione della libera scelta del topo di trascorrere il tempo in uno dei tre compartimenti previsti da una scatola nel corso di due sessioni sperimentali: la prima è adibita all'osservazione della socievolezza, la seconda alla valutazione della novità sociale. In poche parole, dopo un primo adattamento del soggetto nell'ambiente, viene introdotto un topo in una delle due partizioni laterali della scatola e si misura il tempo trascorso con esso e in solitudine. In un secondo momento, a seguito di una familiarizzazione tra i due animali, viene aggiunto un secondo topo, questa volta nella partizione opposta a quella occupata dal primo. In questo modo, si può valutare il tempo trascorso con il conspecifico familiare, in solitudine e con il conspecifico sconosciuto. In accordo con la premessa inerente alla naturale propensione comportamentale, il topo preferisce trascorrere il tempo socializzando, in particolar modo con ciò che è nuovo. Ciò non è stato rilevato nei topi GF dello studio in analisi: essi mostrarono una compromissione sociale, che risultò particolarmente evidente nei maschi; in particolare, si verificò una mancanza della normale preferenza in entrambe le situazioni sociali previste dallo studio. Inoltre, la colonizzazione successiva (post-svezzamento) dei topi GF con uno specifico microbiota intestinale libero da agenti patogeni ha indotto la socialità ma non il fenotipo della novità sociale. Tale risultato dà sostegno all'idea che le finestre dello sviluppo cruciali per il comportamento sociale e influenzate dal microbiota intestinale si collocano probabilmente all'inizio della vita.

Questo studio mostra che il microbiota è cruciale per la programmazione e la manifestazione dei normali comportamenti sociali come la motivazione sociale e la

preferenza per la novità sociale, così come è importante nella regolazione di comportamenti ripetitivi. Visti i deficit nel dominio sociale nei disturbi dello sviluppo neurologico come l'autismo (ma anche la schizofrenia, per esempio) e la presenza di preponderanza maschile, questi dati possono avere implicazioni per la nostra comprensione della genesi di simili patologie.

Attualmente si presta sempre maggiore attenzione all'ossitocina, il peptide ipotalamico che ha dimostrato di avere la capacità di aumentare la socialità. Il topo deprivato geneticamente del recettore dell'ossitocina (tramite *knockout*) mostra notevoli carenze nel comportamento sociale, e alcuni studi preliminari condotti su piccola scala sugli esseri umani indicano che l'ossitocina somministrata per via intra-nasale può alterare positivamente la situazione sociale nei modelli di comportamento. Curiosamente, di recente si è visto che un batterio probiotico ha il potenziale effetto di modulare l'attività ipotalamica dell'ipofisi posteriore e aumentare i livelli di ossitocina; in questo modo, attraverso il microbiota intestinale, potrebbe avere il potere di alterare il comportamento sociale. Sono in corso diversi studi clinici volti a testare l'ossitocina come protagonista di una terapia per i disturbi dello spettro autistico, per cui è attualmente in modo il dibattito sulla sua effettiva utilità nell'uomo (Dinan & Cryan, 2017a).

Un ulteriore elemento che è stato preso in analisi al fine di migliorare la comprensione dei DSA è la modulazione dell'ambiente materno, da ritenersi importante date le origini dello sviluppo neurologico di tali disturbi. Benché siano numerosi i fattori di rischio perinatali che possono influenzare la fisiologia materno-fetale (stress, infezioni, allattamento artificiale, età materna, uso di antibiotici, obesità, diabete gestazionale), è importante nominare i cambiamenti del microbiota come potenziali e rilevanti fattori di rischio (Vuong & Hsiao, 2017).

Uno studio pressoché recente condotto da Buffington et al. (2016) ha analizzato gli effetti dell'obesità materna indotta da una dieta ricca di grassi: si è visto che questa condizione altera il microbioma intestinale della prole e provoca inoltre deficit socio-comportamentali, associati a segnali alterati del sistema mesolimbico della ricompensa. Sorprendentemente, tramite il trapianto del microbiota di topi di controllo ai topi sperimentali ha completamente corretto la compromissione sociale, dimostrando così come il microbiota ha un ruolo chiave nella regolazione del comportamento sociale dei topi. Inoltre, si è osservato che anche l'uso del probiotico *Lactobacillus reuteri* ha l'effetto

di migliorare sufficientemente questo aspetto. Questi risultati relativi al microbiota intestinale si associano alla sua capacità di promuovere la produzione di ossitocina nei neuroni ipotalamici e l'attivazione dell'area tegmentale ventrale. In diverse ricerche è stato dimostrato che l'ossitocina è in grado di ridurre il comportamento ripetitivo negli individui con DSA e di migliorare il riconoscimento delle emozioni nei bambini con la stessa diagnosi (per un approfondimento, si consiglia la consultazione di Hollander et al., 2007).

5.1.1 Evidenze cliniche a sostegno di una terapia basata sul microbiota

Al momento, non ci sono terapie efficaci per i disturbi dello spettro autistico. Generalmente, i genitori di bambini con DSA ricercano interventi a misura delle esigenze specifiche dettate dai sintomi manifestati. L'aumento della prevalenza di questi disturbi impone ancor di più un'urgenza nell'individuazione di trattamenti efficaci e privi di rischi. Negli ultimi anni si assiste ad un accumulo di evidenze che mostrano che la modulazione del microbiota intestinale possa essere considerata una potenziale terapia nei bambini con DSA. Probiotici, prebiotici, trapianto di microbiota e dieta hanno ricevuto notevole attenzione e non mancano risultati incoraggianti per ciascuno dei vari provvedimenti messi in atto. Tuttavia, è necessario sottolineare che le ricerche attualmente disponibili che indagano l'effetto di probiotici e prebiotici su pazienti con DSA risentono di diversi limiti, fra cui la mancanza di un disegno controllato randomizzato e di un campione sufficientemente ampio e che possa considerarsi rappresentativo (Li et al., 2017).

In merito all'applicazione della terapia di trasferimento del microbiota, si cita uno studio clinico aperto che coinvolge un campione di 18 bambini (7-16 anni) con diagnosi di DSA. I soggetti in questione hanno ricevuto un trattamento antibiotico per due settimane, seguito da una dose iniziale elevata di microbiota trapiantato e successive dosi di mantenimento inferiori somministrate quotidianamente per 7-8 settimane. Questo trattamento ha indotto diversi benefici: una riduzione dei sintomi gastrointestinali (ad esempio, costipazione e dolore addominale) e, in una certa misura, un miglioramento dei sintomi principali dei DSA (ad esempio, deficit delle abilità sociali e comportamento ripetitivo). Venne inoltre rilevato un mantenimento degli effetti a 8 settimane di distanza dal trattamento. Il trapianto di microbiota ha anche aumentato la diversità batterica

complessiva e l'abbondanza di microrganismi simbiotici; per di più, questi effetti, incluso il miglioramento delle misure comportamentali, sono stati durevoli nel tempo poiché sono stati nuovamente osservati nello studio di follow-up di due anni della stessa coorte. Tuttavia, è importante riconoscere che lo studio era limitato a un piccolo numero di partecipanti maschi provenienti dagli Stati Uniti e la mancanza di un gruppo di controllo riduce la traducibilità di questo studio ad una popolazione più ampia (Kang et al., 2017; Kang et al., 2019).

Infine, anche l'uso di antibiotici si è dimostrato efficace nel trattamento dei disturbi gastrointestinali e nei sintomi relativi al comportamento sociale manifestati da bambini con DSA. In una ricerca sono stati campionati bambini con autismo ad esordio regressivo e sono stati trattati con vancomicina, un antibiotico orale ad ampio spettro; per un breve periodo si osservarono miglioramenti sia nella presentazione della diarrea sia nei comportamenti autistici (per un approfondimento si veda Sandler et al., 2000).

Concludendo, è evidente come nella comunità scientifica vi sia una potente spinta all'individuazione di efficaci trattamenti dei disturbi dello spettro autistico, dettata soprattutto dai promettenti risultati ottenuti dall'uso dei probiotici sul modello animale. Ad oggi, purtroppo la formulazione di una strategia terapeutica valida è da considerarsi un'ambizione. L'avvicinamento alla sua realizzazione impone la necessità di ulteriori studi che compensino le lacune suddette; inoltre, non è da sottovalutare che il meccanismo che coinvolge il microbioma intestinale nella sintomatologia dei DSA, così come l'eziologia di questi disturbi, sono ancora parzialmente sconosciuti.

L'interesse per la possibilità che il tratto gastrointestinale non sia solo uno spettatore innocente ma abbia piuttosto un ruolo nella patogenesi di queste condizioni, è sicuramente di lunga data. L'ipotesi della *leaky gut* si basa sull'idea che i difetti nella permeabilità della barriera epiteliale intestinale portino a una segnalazione inappropriata da parte di componenti luminali, tra cui batteri, tossine ambientali e persino macromolecole. Sebbene questa ipotesi rimanga popolare e abbia spesso spinto molti genitori a ricercare e sottoporre diete speciali ai figli con autismo, i dati a sostegno di un deficit di permeabilità intestinale sono limitati e non mancano prove a sostegno di una sua normale preservazione (Rao & Gershon, 2016).

È dunque assolutamente necessario un maggiore approfondimento, concentrandosi anche sui fattori di rischio del periodo perinatale per una migliore comprensione delle dinamiche patologiche sottostanti ai DSA.

5.3 I disturbi neurodegenerativi

I disturbi neurodegenerativi sono un complesso di malattie neurologiche, tra le quali per diffusione e notorietà risaltano la malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson, di cui si tratterà in seguito. Essi colpiscono il sistema nervoso centrale, in cui determinano un processo cronico e selettivo di morte cellulare dei neuroni. A seconda del tipo di malattia, il deterioramento neuronale può manifestarsi in diverse forme: si evidenzia una varietà eterogenea di possibili sintomi ascrivibili al declino cognitivo, alla compromissione della funzione motoria, ai cambiamenti nel comportamento e alla demenza.

La prevalenza di questi disturbi è in continuo aumento, inoltre è prevista un'ulteriore crescita negli anni a seguire determinata anche dall'invecchiamento della popolazione. L'epidemiologia desta già di per sé preoccupazione, la quale viene alimentata dalla mancanza di una conoscenza definitiva delle cause che concorrono a determinare l'esordio di questi disturbi, ma anche dall'attuale assenza di trattamenti volti alla cura della maggior parte di essi. È però senz'altro vero che negli ultimi decenni le nozioni relative alla biologia delle malattie neurodegenerative sono cresciute esponenzialmente grazie alla ricerca. Tuttavia, i dati a disposizione non si sono ancora tradotti in interventi in grado di agire sulle cause, interrompendo il processo degenerativo responsabile delle patologie mediante trattamenti risolutivi. Infatti, le terapie sono ancora limitate ad azioni di tipo sintomatico, in alcuni casi capaci di rallentare la progressione dei sintomi o, comunque, di diminuirne l'intensità.

Sebbene ciascuna delle malattie neurodegenerative presenti peculiari patologie cellulari e sintomi clinici, esiste una caratteristica comune a tutte le condizioni: la neuroinfiammazione cronica. Le caratteristiche distintive dell'infiammazione neuronale e cronica includono l'iperattivazione e la disregolazione delle cellule immunitarie diffuse nel cervello, definite microglia. In normali condizioni omeostatiche, le cellule della microglia rimangono in uno stato di riposo. Nel caso delle malattie neurodegenerative invece, assumono una forma ramificata che si estende e si ritrae continuamente, allo scopo

di ricercare invasori stranieri e stimoli patologici nell'ambiente circostante. Una volta individuato un elemento patogeno, le cellule della microglia si attivano, con la conseguente sovra-regolazione della produzione di cellule pro-infiammatorie (Spielman et al., 2018).

Un'altra caratteristica spesso comune e che si affianca all'infiammazione neurale è lo stress ossidativo. Entrambe le condizioni sono normalmente alimentate dal naturale declino fisiologico che si verifica con l'età, e la loro associazione determina un circolo vizioso noto come *inflamm-aging*, definito come “un'infiammazione cronica di basso grado che si sviluppa con l'età avanzata, in assenza di infezione manifesta, e può contribuire a manifestazioni cliniche di altre patologie legate all'età”².

Lo stress ossidativo consiste nell'insieme delle modificazioni che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche quando queste sono esposte ad un eccesso di agenti ossidanti: l'effetto è costituito da alterazioni metaboliche, danno e morte cellulare. Ciò avviene come conseguenza di uno sbilancio del rapporto tra la produzione di radicali liberi (sia della specie dell'ossigeno, ROS, sia della specie dell'azoto, RNS) e la relativa neutralizzazione metabolica tramite gli antiossidanti³. In altre parole, normalmente i radicali liberi vengono convertiti in specie innocue dai sistemi di difesa antiossidanti; tuttavia, con l'avanzare dell'età, la progressiva perdita delle difese cellulari fa sì che ciò non avvenga come di consueto, con il conseguente accumulo di danno cellulare, genetico e di membrana, fino alla definitiva morte cellulare. Nei disturbi di Parkinson e Alzheimer il danno da stress ossidativo è considerevole, in quanto le aree interessate dalla degenerazione sono particolarmente sensibili ai suoi effetti. Il lento accumulo di ROS nei neuroni stimola il rilascio di citochine, le quali a loro volta determinano l'attivazione microgliale e l'infiammazione cerebrale (Westall et al., 2017). È proprio lo stato di neuroinfiammazione riscontrato in queste patologie che ha portato la comunità scientifica a rivolgere l'attenzione verso il microbiota intestinale, con particolare riguardo alla condizione di disbiosi. L'evidenza suggerisce che la microflora enterica, in particolar modo quando è alterata, ha il potere di influenzare il progresso della malattia neurologica, andandone a scaturire persino l'insorgenza. In aggiunta, si sottolinea la crescente consapevolezza che la ridotta diversità microbica intestinale può

² <https://en.wikipedia.org/wiki/Inflammaging>

³ <https://www.centrostressossidativo.it>

configurarsi come possibile fattore di rischio nell'individuo che invecchia, incidendo sullo sviluppo della neurodegenerazione.

In merito al meccanismo dell'infiammazione neurale nello specifico, è stato più volte affermato che il microbiota intestinale gioca un ruolo chiave nell'attivazione della microglia; si è visto infatti che la manipolazione operata sui batteri intestinali, specialmente nei produttori di SCFA, può modulare l'attivazione immunitaria neurale. La sussistenza di questa relazione suggerisce una possibile spiegazione dell'elevata quantità di disturbi gastrointestinali in comorbidità con le malattie neurodegenerative, tra cui si segnalano innanzitutto la disbiosi microbica, ma anche costipazione, diarrea, carenze vitaminiche, diabete e obesità. La co-occorrenza di queste condizioni è indiscutibile e spinge a concentrarsi sull'asse cerebro-intestinale e sul suo coinvolgimento funzionale nel decadimento neuronale. A quanto affermato si aggiunge che i sintomi legati al tratto gastrointestinale sono spesso tra i primi a manifestarsi, suggerendo ancora una volta un ruolo causale della disbiosi nell'insorgenza di queste malattie (Westfall et al., 2017).

Infine, è doveroso sottolineare la natura sporadica delle malattie neurodegenerative, il che significa che possono essere innescate da un insieme di interazioni casuali e dannose con l'ambiente. Ad esempio, il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson sono entrambi associati a fattori come l'esposizione a sostanze tossiche presenti nell'ambiente (per esempio erbicidi, pesticidi e fungicidi), allo stress e alle abitudini relative alla dieta. Non c'è dubbio che anche l'età in sé concorra in qualità di variabile che può interagire e/o potenziare gli effetti del decadimento e dell'infiammazione neurale.

L'età, con cambiamenti derivati nel microbiota, nella barriera intestinale ed ematoencefalica, così come nel sistema immunitario, è un elemento particolarmente rilevante degno di considerazione nello studio di queste condizioni (Westfall et al., 2017; Quigley, 2017).

5.3.1 La malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (PD) è il secondo disturbo neurodegenerativo più comune dopo il morbo di Alzheimer e colpisce più dell'1% della popolazione mondiale con 65 anni o più. È un disturbo del movimento caratterizzato da un'evoluzione lenta e progressiva e si manifesta principalmente con l'incapacità di controllare i movimenti volontari a causa di

profondi cambiamenti nell'organizzazione funzionale di due strutture cerebrali principali, la substantia nigra e le regioni dello striato. Queste alterazioni includono la degenerazione dei neuroni dopaminergici, l'aggregazione di forme fosforilate della proteina neuronale α -sinucleina (α Syn), la disfunzione mitocondriale, la generazione eccessiva di ROS e un aumento dell'attivazione della microglia.

I sintomi extrapiramidali più comuni del PD includono tremori, bradicinesia, difficoltà nella deambulazione, postura ricurva e rigidità muscolare. Invece, tra i sintomi gastrointestinali, i più frequenti sono la costipazione, la perdita dell'appetito, la perdita di peso, la disfagia (termine che indica la difficoltà a deglutire), la scialorrea (salivazione intensa) e il reflusso gastro-esofageo (Rao & Gershon, 2016; Cryan & Dinan, 2017a; Morais et al., 2021).

L'identificazione di parte delle anomalie GI elencate nei pazienti con diagnosi di Parkinson risale a più di trent'anni fa, ed è stato il primo segnale della possibilità che il SNE potesse essere coinvolto nella malattia. Successivamente, Braak et al. (2006) hanno ipotizzato che la malattia abbia origine nell'intestino e si diffonda poi al cervello attraverso l'asse intestino-cervello, percorrendo il nervo vago e il midollo spinale. I corpi di Lewy (delle proteine aggregate, principalmente alfa-sinucleina e ubiquitina), che rappresentano il segno distintivo del PD, sono stati trovati nel SNE nei casi post-mortem di PD precoce. Inoltre, gli aggregati di α -sinucleina sono presenti nelle mucose del sistema nervoso enterico ancor prima della loro rilevazione nel cervello, il che può indicare una diffusione da intestino a cervello attraverso il nervo vago (Cryan et al., 2019).

Un ulteriore sostegno deriva dalla ricerca di Svensson e colleghi: gli autori hanno esaminato tutti i pazienti danesi sottoposti a vagotomia nel periodo 1977-1995 e li hanno confrontati con una coorte di popolazione generale abbinata. Hanno esplorato il rischio di sviluppare la malattia di Parkinson a seguito di una vagotomia troncale completa o di una vagotomia selettiva. È stata rilevata una riduzione significativa del rischio nei pazienti sottoposti a una vagotomia troncale completa rispetto a coloro che si erano sottoposti a vagotomia selettiva. Questi ultimi avevano un rischio simile a quello relativo alla popolazione generale. Conseguentemente a questi risultati, è evidente il suggerimento di un coinvolgimento del nervo vago nella patogenesi del disturbo. Ciò è particolarmente importante anche in vista del ruolo chiave del nervo vago nella mediazione della

segnalazione dal microbioma intestinale al cervello (Figura 10) (Svensson et al., 2015; Dinan & Cryan, 2017b).

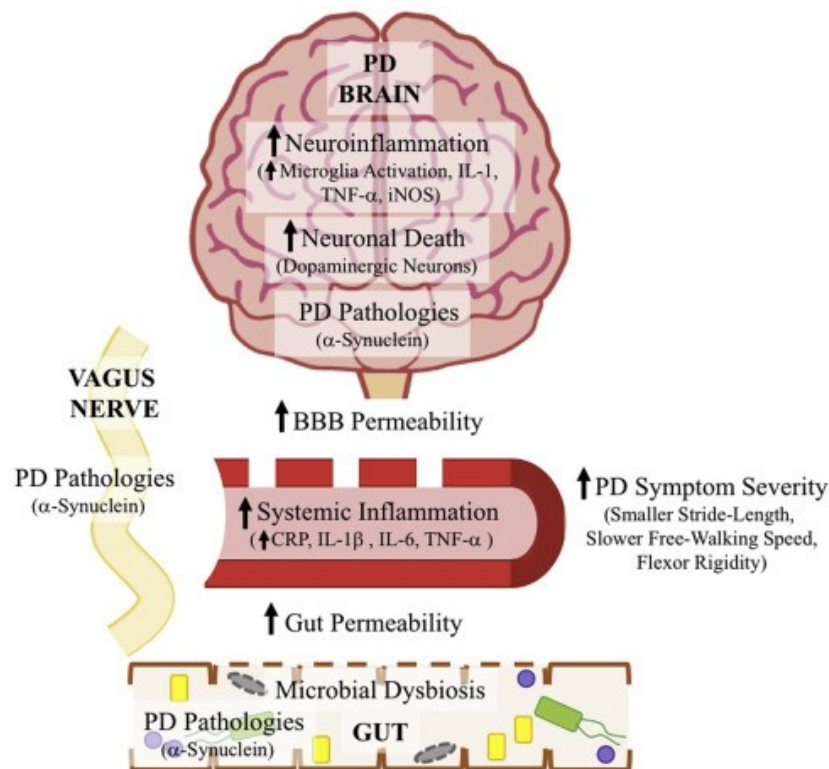


Figura 10: Il ruolo del microbioma intestinale nella patogenesi del disturbo di Parkinson. La disbiosi enterica promuove un aumento della permeabilità della barriera intestinale, da cui deriva un'infezione sistemica e, successivamente, neurale. Anche l' α -sinucleina viene trasferita al cervello attraverso il nervo vago. Abbreviazioni: BBB, barriera ematoencefalica; CRP, C⁴; IL, interleuchina⁵; iNOS⁶, sintetasi inducibile dell'ossido nitrico; PD, disturbo di Parkinson; TNF, fattori di necrosi tumorale (Spielman et al., 2018).

La comunità scientifica sta sviluppando un interesse considerevole nella comprensione del ruolo del microbiota nel contesto del disturbo di Parkinson.

Lo studio principale che descrive le alterazioni nel profilo microbiotico intestinale ha confrontato pazienti con PD e controlli sani, ottenendo risultati interessanti. La ricerca si è basata sull'analisi del microbiota fecale di 72 individui con diagnosi di PD, campionata a una mediata di cinque anni dalla comparsa dei sintomi motori. È stata rilevata una quantità elevata di batteri delle *Enterobacteriaceae*, contrapposta a una riduzione delle *Prevotellaceae* negli individui con diagnosi del disturbo. La *Prevotella* contribuisce insieme ad altre specie microbiche alla generazione di una barriera protettiva lungo l'epitelio intestinale, per cui la sua riduzione potrebbe essere coinvolta nei sintomi

⁴ "CRP, o C, è una proteina presente nel sangue durante l'infezione (da infezione o da danno tissutale)" *Orthopaedic Physical Therapy Secret (Third Edition)*, 2017

⁵ "Le interleuchine (IL) sono citochine, delle cellule segnalatrici del sistema immunitario"

⁶ iNOS è uno degli enzimi adibiti alla produzione di radicali liberi

gastrointestinali. Invece, l'aumento di *Enterobacteriaceae* è stato positivamente associato ad un aumento dei livelli di instabilità posturale e ai disturbi dell'andatura (Scheperjans et al., 2015).

Un altro studio prezioso e che ha ricevuto molta attenzione ha dimostrato che il microbiota è necessario per promuovere la patologia derivata dall' α -sinucleina, la neuroinfiammazione e le tipiche caratteristiche motorie in un modello animale convalidato. Oltre a queste evidenze, gli autori della ricerca hanno identificato uno specifico metabolita microbico che si è rivelato essere sufficiente per determinare l'insorgenza dei sintomi del disturbo di Parkinson: gli acidi grassi a catena corta mostrarono la capacità di favorire la neuroinfiammazione mediata dall' α -sinucleina. È notevole inoltre che i microbi fecali provenienti da pazienti malati di PD compromettono significativamente la funzione motoria del topo, molto più di quanto faccia il microbiota proveniente da controlli sani. Questo risultato suggerisce che vi siano specifici batteri intestinali associati al disturbo, piuttosto che una generale stimolazione microbica, in grado di generare i sintomi del disturbo di Parkinson (Sampson et al., 2016).

Le evidenze ad oggi disponibili sembrano dunque sostenere una possibile origine del disturbo nel SNE e una seguente diffusione al SNC, ma non è tuttavia da scartare l'ipotesi che la patogenesi segua il percorso opposto o, ancora, che avvenga in entrambi i luoghi con decorso temporale differente (Mulak & Bonaz, 2015).

I cambiamenti legati all'età nel microbiota enterico, in particolare relativi alla riduzione della diversità di specie, all'alterazione della motilità e della barriera intestinale e alla compromissione della funzione immunitaria, potrebbero essere collegati alla neurodegenerazione naturalmente associata all'avanzare dell'età. Si sostiene vi sia un'importante variazione interindividuale tra gli anziani per quanto riguarda la composizione microbica, alla quale si affianca una relazione decisamente significativa tra microbiota, dieta e vita istituzionale o comunitaria. È possibile che i meccanismi di funzionamento dell'asse microbiota-intestino-cervello detengano la spiegazione delle differenze che si riscontrano nella prevalenza del disturbo di Parkinson tra gli ambienti rurali e urbani, tra paesi diversi e tra i due sessi.

In merito alle abitudini, a livello alimentare sappiamo che una dieta ricca di fibre migliora la crescita dei batteri del colon capaci di produrre SCFA, la cui proprietà principale è quella di generare un effetto antinfiammatorio sistemico. Pertanto, diversi

studi che hanno utilizzato probiotici e prebiotici come intervento migliorativo della flora batterica hanno ottenuto promettenti risultati di beneficio nella salute dell'anziano (Mulak & Bonaz, 2015).

Curiosamente, le prove epidemiologiche finora condotte sostengono inequivocabilmente che il rischio di insorgenza del PD sia inferiore nei soggetti fumatori e nei bevitori di caffè. Nell'ampia metanalisi di 61 studi caso-controllo e di coorte è stato evidenziato che il rischio di Parkinson è inferiore del 60% tra i fumatori di sigarette rispetto ai non fumatori, mentre è inferiore del 30% tra i bevitori di caffè rispetto a coloro che non ne fanno uso (Hernán et al., 2002). Purtroppo, però, le spiegazioni di questi riscontri sono ancora controverse: alcuni sostengono che, semplicemente, vi sia un tratto di personalità pre-morbo che si associa all'insorgenza della malattia, altri invece si soffermano sull'effetto neuroprotettivo di nicotina e caffeina, altri ancora, come si vedrà, si concentrano sulla mediazione del microbiota nella diffusione degli effetti delle due sostanze. Per esempio, Derkinderen et al. (2014) hanno proposto che gli effetti positivi del fumo e del consumo di caffè passino attraverso la modulazione dell'asse microbiota-intestino-cervello. Entrambe le sostanze possono alterare la composizione del microbiota in una configurazione tale che mitiga l'infiammazione intestinale. Questo, a sua volta, potrebbe portare a un minor ripiegamento errato di α -syn nel SNE, riducendo il rischio di PD tramite la minor propagazione della proteina al SNC.

Infine, è stato anche dimostrato che il consumo di caffè sia nei topi che nell'uomo provoca un aumento significativo dei Bifidobatteri, i quali hanno proprietà antinfiammatorie (Mulak & Bonaz, 2015).

5.3.2 La malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer (AD) è la forma più comune di demenza negli anziani, con sintomi che colpiscono la sfera cognitiva e comportamentale. Si tratta di un grave problema di salute pubblica e la previsione attuale avverte un aumento dell'incidenza e della prevalenza, fino a raggiungere proporzioni epidemiche nei prossimi decenni a meno che non venga sviluppato un intervento volto a prevenire o rallentare e ridurre il progresso della malattia. L'AD non solo causa grave disagio per i pazienti e gli operatori sanitari e familiari che se ne occupano, ma si traduce anche in un grande onere economico per la società.

Le principali sfide attuali relative al morbo includono la mancanza di biomarcatori affidabili per la sua diagnosi precoce, nonché la mancanza di strategie e trattamenti preventivi. Pertanto, si sta puntando a una maggiore comprensione della patogenesi molecolare dell'AD, al fine di individuare migliori piani diagnostici e terapeutici.

L'AD è convenzionalmente considerato come un disturbo del SNC. Tuttavia, come si vedrà nel corso del paragrafo, l'aumento delle evidenze sperimentali, epidemiologiche e cliniche ha conferito forza all'ipotesi che le radici e manifestazioni della malattia si estendano ben oltre il cervello (Wang et al., 2017; Sochocka et al., 2019). All'inizio degli anni '90, l'ipotesi della cascata amiloide è stata l'ipotesi principale proposta come spiegazione della fisiopatologia dell'AD. Attualmente, è ampiamente accettato che la patologia amiloide può insorgere dai 10 ai 20 anni prima della comparsa dei primi sintomi del declino cognitivo e della diagnosi del disturbo. Tuttavia, la deposizione di amiloide nel cervello non è l'unico fattore determinante dello sviluppo della demenza. Una delle conseguenze della deposizione di amiloide è l'attivazione delle risposte immunitarie nel cervello, così come si è visto nel caso dei corpi di Lewy nel disturbo di Parkinson. I depositi di amiloide- β ($A\beta$) attivano la microglia, determinando una risposta infiammatoria nel SNC. Una risposta neuroinfiammatoria acuta e autolimitante dovrebbe normalmente portare alla *clearance*⁷ dell' $A\beta$, al fine di garantire la protezione neuronale. Tuttavia, durante il processo di invecchiamento, si verificano alcuni cambiamenti nel sistema immunitario (immunosenescenza) e nella risposta immunitaria correlata alla microglia. Come è già stato accennato, l'attivazione persistente della microglia determina una risposta infiammatoria cronica che supporta i processi neurotossici, con conseguenti lesioni cerebrali e morte neuronale. Inoltre, la microglia reattiva stimola l'attivazione degli astrociti, un'altra importante cellula gliale che supporta il funzionamento dei neuroni. Queste cellule contribuiscono al carico neuroinfiammatorio e alla disfunzione della barriera ematoencefalica, la quale, con l'avanzare dell'età, perde progressivamente il suo potere protettivo. Ciò facilita il rischio dell'ingresso nel cervello di un ampio spettro di agenti patogeni (virus, batteri, funghi), di cellule immunitarie e dei loro prodotti.

⁷ La clearance è intesa come capacità di smaltimento di una certa sostanza presente nel sangue; viene espressa come quantità di sangue che, nell'unità di tempo, viene depurata dalla sostanza indesiderata per azione dell'organo a ciò deputato. Fonte: <https://www.corriere.it/salute/dizionario/clearance>

È stato ipotizzato che il decadimento della barriera ematoencefalica e la maturazione dello strato endoteliale cerebrale instabile potrebbero dipendere da alterazioni nel microbioma intestinale. Questa proposta dà sostegno alla possibilità di un'associazione di infezioni croniche con le malattie neurodegenerative e dello sviluppo neurologico (Sochocka et al., 2019).

Nonostante la convinzione duratura e forte relativa al coinvolgimento delle placche amiloidi, vi sono prove crescenti che aumentano i dubbi relativi all'ipotesi, supportando sempre più una mancanza di correlazione tra i depositi di A β e la manifestazione clinica della malattia. Molti pazienti con demenza non hanno depositi di A β nel cervello, mentre il cervello di molti anziani non affetti dalla patologia rivela tante placche senili quanto quello dei pazienti con demenza. Ci sono forti suggerimenti che la deposizione di amiloide A β sia un fenomeno correlato all'invecchiamento, completamente indipendente e non correlato all'insorgenza del morbo (Davis et al., 1999; Chételat et al., 2013).

Recentemente, l'ipotesi infiammatoria dell'AD sta diventando sempre più significativa e convalidata. L'AD è considerata una malattia sistemica poiché è correlata sia alla neuroinfiammazione nel cervello, sia alle reazioni infiammatorie nei sistemi periferici. Ciò che è più importante è che i processi infiammatori nel cervello potrebbero essere avviati e agiscono molti anni prima che compaiano placche senili, e che la produzione di A β sia in realtà collegata a una risposta antimicrobica. A sostegno di quanto ipotizzato, è stata dimostrata un'attività antimicrobica di A β contro funghi, batteri e virus. Si può immaginare che l'A β sia prodotto in seguito ad ogni nuova infezione (derivata dal passaggio dei microbi patogeni dalla periferia al cervello), o conseguentemente alla riattivazione di un'infezione latente nel tessuto cerebrale. A tale proposito, diversi studi hanno mostrato che l'amiloide funziona da peptide antimicrobico mediante la formazione delle placche, bloccando per esempio l'invasione del batterio della *Salmonella enterica*, del fungo *Candida albicans*, del virus dell'*Herpes simplex* e dei parassiti come il *Toxoplasma gondii* (come citato da Stilling & Cryan, 2016; Hill et al., 2014).

È fondamentale non trascurare poi che il microbioma intestinale disbiotico produce e rilascia sulla superficie della mucosa intestinale una miscela di sostanze, secrezioni e prodotti metabolici contenenti un ampio gruppo di composti che aumentano significativamente la funzione immunitaria innata, che si traduce nella produzione di citochine e mediatori infiammatori. Questi composti provocano un ulteriore

deterioramento della permeabilità della mucosa intestinale e della barriera emato-encefalica, determinando così un incremento significativo delle risposte infiammatorie e dell'aggregazione amiloide (Figura 11) (Spielman et al., 2018; Sochocka et al., 2019).

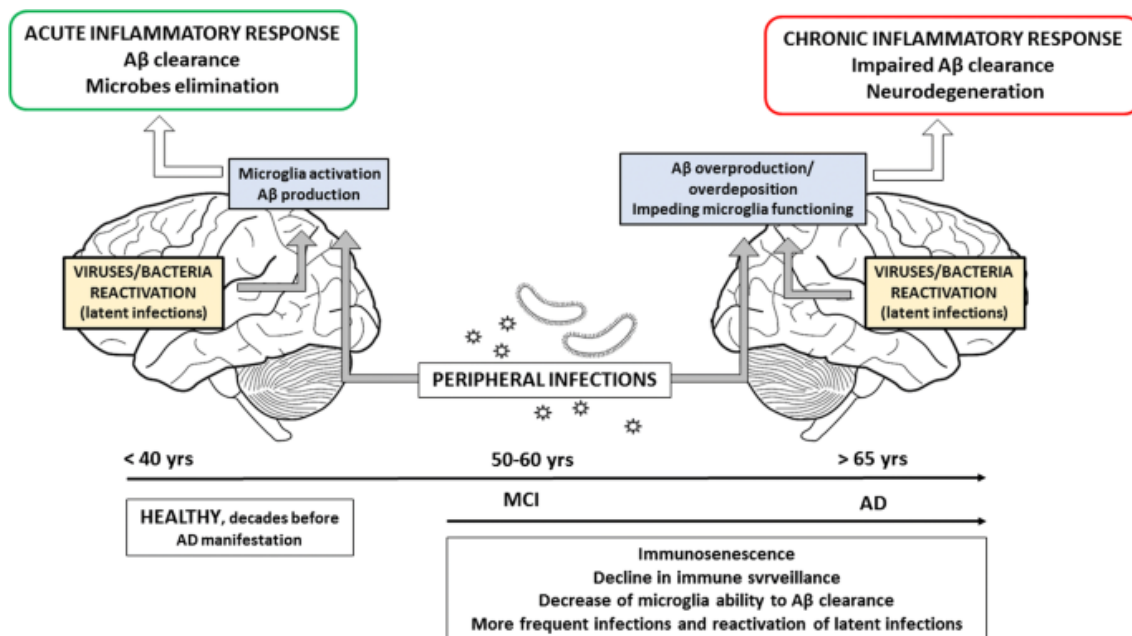


Figura 11: I cambiamenti età-relati della risposta neuroinfiammatoria del SNC. L'esposizione periferica a infezioni ha un impatto diverso a seconda dell'età in cui si verifica: mentre all'età di 40 anni (o meno) la contrazione si traduce in una risposta infiammatoria acuta a livello centrale ma non si presentano sintomi relativi all'AD, dai 50-60 anni in poi si può innescare una risposta infiammatoria cronica e può insorgere AD o disturbo cognitivo lieve (MCI). Ciò accade in concomitanza dei cambiamenti età-relati a livello immunitario (Sochocka et al., 2019).

È utile sottolineare che l'invecchiamento è la ragione del declino generale della risposta immunitaria e della diminuzione della capacità della microglia di correggere la clearance dell'Aβ e la fagocitosi dei patogeni. Pertanto, nel corso degli anni queste condizioni portano al passaggio della risposta infiammatoria da acuta a cronica, il che significa che il meccanismo protettivo dell'infiammazione, di per sé benefico, diviene dannoso.

L'età va a sommarsi alla molteplicità di fattori di rischio relati allo stile di vita e all'attacco delle infezioni, aumentando la probabilità dell'instaurazione di uno stato di disbiosi nel microbiota intestinale che provoca un aumento del rischio di disturbi neurodegenerativi. Le evidenze a sostegno di un coinvolgimento della periferia del corpo nella malattia di Alzheimer si contrappongono sempre più alla convinzione dell'esclusività del SNC nella sua patofisiologia. Piuttosto, sembra essere molto probabile che infezioni periferiche croniche e l'alterazione della microflora intestinale procurino cambiamenti patologici in tessuti differenti, anche distanti dal punto in cui l'infezione ha

avuto luogo. Infine, è altrettanto possibile che i mutamenti nel cervello inizino e continuino la loro evoluzione in maniera silente, molti anni prima della comparsa dei sintomi del morbo (Sochocka et al., 2019).

5.3.3 Evidenze cliniche a sostegno di un intervento basato sul microbiota

Nonostante i grandi sforzi, la ricerca di terapie per i disturbi neurodegenerativi richiede sicuramente un impegno considerevole, in parte anche a causa dei limiti degli attuali modelli animali e della mancanza di una comprensione completa della patologia.

Ad esempio, i modelli murini del morbo di Parkinson sono di per sé limitati nella capacità di ricapitolare la totalità della malattia umana. Idealmente, un modello animale sarebbe di natura progressiva e i segni del PD si svilupperebbero in periodi di tempo relativamente lunghi, poiché il fattore di rischio principale per il disturbo è l'età. Chiaramente, questa linea temporale relativa al decorso non è facilmente riproducibile nei modelli animali (Morais et al., 2019).

Il valore traslazionale delle terapie dell'asse microbiota-intestino-cervello per i pazienti con AD è attualmente una questione aperta. Uno studio randomizzato in doppio cieco, controllato con placebo ha previsto la somministrazione di un probiotico multiceppo (una bevanda a base di latte contenente le specie *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. bifidum*, e *L. fermentum*)⁸ in pazienti con Alzheimer. Gli autori hanno rilevato miglioramenti nel *Mini Mental State Examination* dopo 12 settimane di assunzione (Akbari et al., 2016).

Tuttavia, un altro studio si contrappone a quanto trovato in quanto la ricerca (condotta anche in questo caso in doppio cieco e controllata con placebo) non ha individuato miglioramenti significativi nella cognizione di pazienti con AD grave dopo 12 settimane di consumo di un probiotico contenente lattobacilli e bifidobatteri (Agahi et al., 2018).

Resta ancora molto lavoro da fare per capire se prendere di mira l'asse microbiota-intestino-cervello sia una giusta mossa verso miglioramenti clinicamente significativi che rallentino o arrestino la progressione dell'Alzheimer. La letteratura attuale fornisce alcune prove preliminari che inducono a pensare che la terapia psicobiotica possa un

⁸ B. indica il genere Bifidobacterium, L. il genere Lactobacillus

giorno essere considerata una possibile strategia aggiuntiva nel trattamento o anche nella prevenzione della progressione della malattia nella fase prodromica. Tuttavia, benché ci sia fiducia nella potenzialità intrinseca a questa direzione di intervento, vi sono evidenze controverse (Cryan et al., 2019).

Nonostante le limitazioni illustrate, ulteriori ricerche sul ruolo del microbiota intestinale nella fisiopatologia del morbo di Parkinson e della malattia di Alzheimer, insieme ai dati clinici ed epidemiologici emergenti sull'uomo, rappresentano un'entusiasmante frontiera nella biomedicina. Queste nuove aree di indagine potrebbero aiutare la comprensione dei meccanismi patologici legati alla neurodegenerazione, e guidare la scoperta e lo sviluppo di trattamenti promettenti per migliorare la vita di milioni di persone in tutto il mondo (Morais et al., 2021).

5.4 Stress, ansia e depressione

L'ansia e i disturbi depressivi sono condizioni psichiatriche onnipresenti e debilitanti che colpiscono collettivamente quasi il 10% della popolazione mondiale ogni anno⁹. È considerevole il peso economico, sociale e personale di queste manifestazioni patologiche, al punto che in alcuni casi la compromissione si configura come una disabilità per chi la vive. Sebbene l'uso di trattamenti psicoterapeutici e farmacologici sia in costante aumento negli ultimi anni, la prevalenza e il carico di questi disturbi è rimasto pressoché inalterato. A questo si aggiunge la variazione sostanziale nella risposta ai trattamenti ad oggi disponibili, che mostra traccia di efficacia in meno della metà dei pazienti con diagnosi. Pertanto, sussiste una necessità urgente di fare luce sulla patofisiologia dei disturbi ansiosi e depressivi, al fine di sviluppare interventi con un potenziale maggiore nella risoluzione dei sintomi (Simpson et al., 2021).

Lo stress, la depressione e l'ansia sono condizioni altamente co-morbose e hanno meccanismi ed espressioni biologiche sovrapposte nell'uomo. Inoltre, i modelli animali individuati in questo ambito di ricerca non traducono in maniera così distinta i segni ascrivibili a ciascuna manifestazione quando viene rilevata nell'individuo, per cui generalmente la comunità scientifica osserva il coinvolgimento dell'asse microbiota-intestino-cervello studiando le tre condizioni contemporaneamente.

⁹ World Health Organization, 2017

Depressione e ansia sono condizioni psichiatriche legate a fallimenti dell'allostasi, il processo tramite il quale il corpo risponde allo stress psicologico e ripristina l'omeostasi. L'allostasi comporta la regolazione dinamica dei sistemi di risposta allo stress del corpo, inclusa la segnalazione neuroendocrina attraverso l'asse HPA che regola la produzione di glucocorticoidi (per esempio il cortisolo) e la presenza del BDNF. I glucocorticoidi rilasciati durante i periodi di stress controllano le condizioni omeostatiche in tutto il corpo e possono dare il via a risposte infiammatorie (Morais et al., 2021).

Le differenze individuali nella reattività allo stress nel corso della vita e nella suscettibilità ai disturbi legati allo stress sono state collegate sia a fattori genetici che ambientali, con particolare riguardo alle esposizioni precoci che hanno la potenzialità di alterare l'assemblaggio dello sviluppo e la funzione dei circuiti neurali centrali. Curiosamente, è diventato sempre più chiaro che i batteri sono necessari per il normale sviluppo del cervello (Hsiao et al., 2013; Bercik et al., 2011) e la funzione cerebrale in età adulta. Infatti, è stato rilevato che i processi chiave associati alla neuroplasticità nel cervello adulto come la neurogenesi e l'attivazione della microglia vengono regolati dal microbiota. Risultati come questi hanno contribuito a un cambiamento di paradigma nelle neuroscienze e nella psichiatria (Mayer et al., 2014b; Cryan & Dinan, 2012), in cui viene contemplato il possibile ruolo e l'influenza del microbiota nello sviluppo precoce e la successiva funzione del cervello (Foster et al., 2017).

Sono molteplici le fonti della letteratura che sostengono vi sia un'alterazione dell'asse HPA nei disturbi psichiatrici legati all'ansia e alla depressione e che questa sia associata ad alti livelli di cortisolo e di mediatori dell'infiammazione che determinano uno stato pro-infiammatorio. Conseguentemente alla natura bidirezionale dell'interazione tra microbiota intestinale, intestino e cervello, deriva non solo che la microflora può contribuire a incrementare l'infiammazione e il livello di cortisolo in circolo, ma anche che lo stato infiammatorio può indurre alterazioni nel microbiota tramite effetti dannosi sulla salute gastrointestinale (Figura 12) (Foster & Neufeld, 2013; Moloney et al., 2014; Simpson et al., 2021).

Il microbioma influenza anche la struttura e la funzione dell'amigdala, una regione chiave del cervello correlata allo stress. L'amigdala è fondamentale per l'apprendimento emotivo e il comportamento sociale ed è centrale nella determinazione delle risposte comportamentali e fisiologiche agli stimoli stressanti, in particolare quelli che scatenano

ansia e/o paura. I processi amigdalari alterati sono stati associati a una varietà di condizioni neuropsichiatriche che vanno dai disturbi dello spettro autistico ai disturbi d'ansia (Foster et al., 2017).

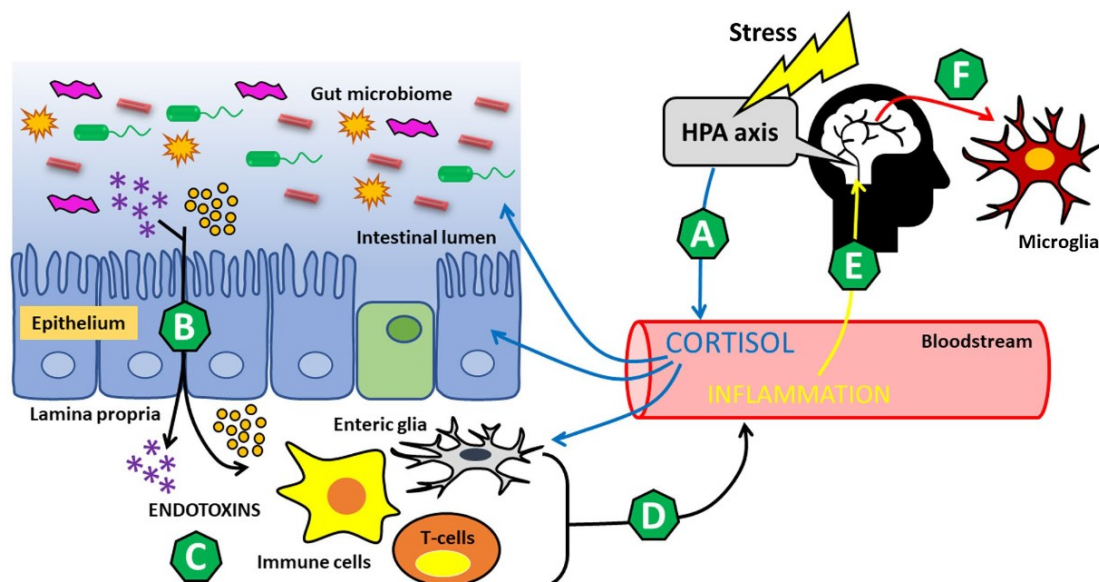


Figura 12: Lo stress nella comunicazione bidirezionale tra microbioma intestinale e SNC. Lo stress (A) attiva l'asse HPA, con la conseguente stimolazione del rilascio del cortisolo nel flusso sanguigno, fino a giungere nell'intestino, di cui altera la permeabilità (B). L'incremento della permeabilità causa l'uscita di endotossine dall'intestino (C), che inducono l'attivazione del sistema immunitario ed entrano nel flusso sanguigno (D). La risposta immunitaria si diffonde al SNC (E), determinando un'inflammatione neuronale che compromette la salute mentale. Lo stress innesca l'attivazione delle cellule della microglia (F) come parte della risposta infiammatoria (Peirce & Alviña, 2019).

È stato più volte evidenziato che livelli eccessivi di mediatori dell'inflammatione e di cortisolo possono intaccare la permeabilità intestinale, consentendo a batteri di permeare nel flusso sanguigno fino a scatenare un'inflammatione cronica nel SNC. Ne consegue che la perturbazione infiammatoria condotta dal microbiota può contribuire, già da sé, all'insorgenza di disturbi affettivi, dovuti in parte all'incremento della permeabilità della barriera intestinale. La manifestazione patologica più rappresentativa di quanto appena affermato si riscontra in quelle condizioni gastrointestinali che si suppone coinvolgano alterazioni del microbiota e nella permeabilità intestinale e che mostrano una chiara co-occorrenza con i disturbi psichiatrici: tra queste, il miglior prototipo è sicuramente la sindrome dell'intestino irritabile (Dinan et al., 2013; Foster et al., 2017; Simpson et al., 2021).

Le prime evidenze del coinvolgimento cruciale del microbiota intestinale nelle manifestazioni stress-relate nel comportamento, nella funzione cerebrale e nella fisiologia giungono principalmente da studi su animali. Tra questi, particolarmente rilevante è una ricerca che è stata più volte replicata e confermata nei preziosi risultati ottenuti: lo studio di Sudo et al. (2004) ha chiaramente dimostrato non solo che i microbi residenti nell'intestino hanno la capacità di regolare la risposta allo stress attraverso l'influenza sull'asse HPA, ma anche che possono regolare le funzioni del SNC tramite l'attivazione neurale dei circuiti dello stress. Ricerche sviluppate in seguito hanno continuato a supportare la connessione tra il microbiota e i meccanismi di risposta allo stress e hanno anche dimostrato che l'esposizione precoce, come anche in età adulta, può indurre un cambiamento nel profilo microbico, il quale, una volta alterato, può modificare la risposta allo stress (si vedano gli studi di O'Mahony et al., 2009 e Jarasevic et al., 2015 approfonditi nel paragrafo 1.5).

Lo studio di De Palma et al. (2015) ha approfondito il ruolo dei commensali batterici intestinali nello sviluppo della disperazione comportamentale utilizzando il modello di separazione materna. Nella loro ricerca, una storia evolutiva di separazione materna è stata associata ad un aumento del corticosterone circolante nei topi GF adulti, ma non a comportamenti depressivi o ansiosi. Pertanto, la presenza di microbiota intestinale può essere inutile per la capacità della separazione materna precoce di alterare l'attività dell'asse HPA correlata allo stress, ma può essere necessaria per alterare lo sviluppo di comportamenti ansiosi e depressivi.

Risultati interessanti derivano anche dallo studio di razze diverse dello stesso animale: è interessante notare che quando il microbiota di topi *Balb/C*, un ceppo che mostra in modo riproducibile un fenotipo ansioso, viene trapiantato nel ceppo di topo GF *Swiss Webster* non ansioso, i comportamenti ansiosi vengono trasmessi. Inoltre, quando è stato condotto il trapianto inverso, ovvero dal *Swiss-Webster* in topi GF *Balb/C*, il fenotipo di ansia è stato attenuato. Quanto osservato suggerisce ancora una volta che il microbiota è coinvolto nelle manifestazioni affettive (Belzung & Griebel, 2001).

Un'altra fonte preziosa ai fini della comprensione della dinamica è stato sicuramente l'insieme di studi che hanno utilizzato il trapianto di microbiota fecale dall'uomo all'animale, così da valutare l'effetto dei batteri intestinali sul comportamento. Grazie a queste ricerche si è visto che il microbiota di pazienti con determinate diagnosi

psichiatriche come la depressione ha il potere, una volta introdotto nell'animale, di apportare delle modifiche comportamentali che si collegano alla patologia sofferta dall'individuo donatore.

Nell'ambito farmaceutico sono stati rilevati degli effetti degni di nota che sostengono la comunicazione tra intestino e cervello nelle patologie psichiatriche. Per esempio, gli antidepressivi sono ben noti per avere potenzialità antimicrobiche: modulano la fisiopatologia dell'ansia e della depressione rimodellando non solo la biochimica del cervello, ma anche il microbiota intestinale. Al contrario, alcuni antibiotici (come i β -lattamici e le tetracicline) hanno potenziali proprietà antidepressive nei roditori e nell'uomo. Di contro, studi epidemiologici hanno suggerito che alcune classi di antibiotici come i fluorochinoloni sono associate allo sviluppo di depressione e ansia (Lach et al., 2018).

Gli elementi presi in analisi ed altri ancora hanno indotto a studiare il profilo microbico dei pazienti con diagnosi di disturbi depressivi, in particolare di disturbo depressivo maggiore. È stato osservato che gli individui con depressione sono stati associati a una produzione deficitaria di metaboliti neuroattivi da parte del microbiota e ad una compromissione dell'integrità della barriera intestinale (Bastiaanssen et al., 2020).

Come per altre condizioni patologiche, in più occasioni è stata trovata una significativa differenza nella composizione microbica rispetto ai controlli sani, così come sono state individuate delle predominanze di generi batterici specifici, anche se su questo aspetto l'accordo viene a mancare (si veda la review di Bastiaanssen et al., 2020). È importante notare che, benché sia stata rintracciata una discrepanza nel confronto dei profili microbici, questo non permette di desumere un ruolo causale del microbioma intestinale nello sviluppo del disturbo. Ciononostante, alcune evidenze precliniche ne supportano il coinvolgimento: due studi hanno utilizzato la tecnica della FMT e hanno osservato i suoi effetti in seguito a trapianto da individui depressi a ratti e topi; in entrambi i casi, i ricercatori hanno osservato un aumento dello stato di infiammazione e un incremento dei comportamenti considerati rappresentativi dell'anedonia e dell'ansia¹⁰ rispetto alle cavie a cui non era stato sottoposto l'intervento (Kelly et al., 2016; Zheng et

¹⁰ L'anedonia è stata valutata tramite il *sucrose preference test*, mentre l'ansia tramite gli strumenti *open field test* ed *elevated plus maze test*

al., 2016). Da questi risultati si può supporre una capacità del microbiota di influenzare l'umore e il comportamento.

In passato, si pensava che le malattie infettive fossero la causa di molti disturbi psichiatrici. La sifilide è un buon esempio in quanto presenta deficit neurologici centrali, compresa la demenza, derivanti da infezione cronica. La malattia di Lyme è una malattia multisistemica causata per infezione da *Borrelia burgdorferi spirochete*. I sintomi cronici comuni riportati includono scarsa memoria e concentrazione e una serie di altri deficit neuropsicologici. Anche gli stati depressivi sono comuni: la prevalenza varia dal 26% al 66% dei pazienti affetti. Pertanto, è da tempo riconosciuto che alcuni agenti patogeni hanno il potere di produrre una sindrome depressiva (Dinan et al., 2013).

Anche l'ansia è stata inizialmente studiata nel contesto dell'infezione. In tale ambito è stato possibile osservare che i batteri patogeni in dosi ridotte al punto da non innescare un'infezione possono apportare cambiamenti a livello centrale. A tale proposito, Lyte et al. (1998) hanno dimostrato che la somministrazione orale di dosi subcliniche (che non innescano un'infezione) del patogeno *Campylobacter jejuni* provoca nei topi un comportamento simile all'ansia, deducibile dalla diminuzione del comportamento esplorativo misurato. Inoltre, è stata rilevato che le aree attive del tronco cerebrale, in particolare quelle del nucleo del tratto solitario e del nucleo parabrachiale laterale, partecipano nell'elaborazione delle informazioni neurali che innescano le risposte autonome, neuroendocrine e comportamentali.

5.4.1 Evidenze cliniche a sostegno di una terapia basata sul microbiota

Il campo di trattamento più promettente in cui la comunità scientifica sta avanzando la propria ricerca prevede senza dubbio l'intervento nutrizionale tramite psicobiotici, una categoria di componenti attive che comprende i probiotici e i prebiotici.

Data la frequente presenza di ansia e disturbi depressivi tra i sintomi sofferti da coloro che soffrono della sindrome dell'intestino irritabile, molti ricercatori hanno rivolto il loro interesse alle conseguenze della modulazione del microbiota, con l'intento di approfondire sia se terapie psicologiche possano alleviare i disturbi gastrointestinali, sia se interventi sul microbiota possano indurre miglioramenti nei sintomi psicologici. Attualmente sono disponibili risultati incoraggianti in entrambe le opportunità di trattamento, e ciò sottolinea ancora una volta quanto siano strettamente collegati

l'intestino e il cervello e come l'azione su uno di essi si riproponga, inevitabilmente, sull'altro (Dinan et al., 2013). Considerato poi il tasso di refrattarietà alla gestione medica, è sempre più frequente la raccomandazione che spinge a sottoporsi a interventi psicologici. Una metanalisi di Black et al. (2020) è stata condotta al fine di stimare l'efficacia relativa alle terapie psicologiche e psicoterapeutiche per la cura della sindrome dell'intestino irritabile. Sono emerse prove a sostegno della loro efficacia, nello specifico rispetto agli interventi di terapia cognitiva e comportamentale (CBT) auto-somministrata a contatto limitato, CBT in presenza e ipnosi, in relazione alla riduzione della sintomatologia legata alla diagnosi. I pazienti con sintomi refrattari hanno inoltre ottenuto maggiori benefici da queste strategie di intervento, soprattutto grazie alla CBT di gruppo e all'ipnosi.

Riguardo a stress, ansia e depressione, la revisione di Smith et al. (2021) ha valutato l'efficacia di prebiotici, probiotici e simbiotici riscontrata in un totale di dodici studi condotti su individui che, al momento della ricerca, soffrivano di uno di questi disturbi. La scelta di selezionare questo tipo di ricerche rende ancora più importanti i risultati evidenziati, in quanto è molto più frequente che venga osservato l'effetto dei modulatori del microbiota su individui sani. A prescindere però dalla singolarità di questa raccolta, è stato trovato un complessivo accordo tra gli studi presi in analisi e quelli svolti con individui di controllo. L'analisi ha permesso di individuare un'evidenza di efficacia nel trattamento con gli psicobiotici: i probiotici e i prebiotici hanno ridotto i punteggi di ansia negli adulti con sindrome da stanchezza cronica e pazienti con carcinoma laringeo preoperatorio, hanno alleviato i sintomi del disturbo depressivo maggiore nonché la depressione da lieve a moderata. Inoltre, le risposte allo stress e l'attivazione immunitaria sono state migliorate a seguito di un intervento psicobiotico in adulti stressati e studenti universitari.

Di conseguenza, si può affermare che gli psicobiotici, agendo sul microbiota intestinale, offrono potenziali opzioni di trattamento alternative nei disturbi dell'umore come la depressione, nei disturbi d'ansia e nei loro sintomi di accompagnamento. Ciò genera indiscutibilmente entusiasmo nella comunità scientifica, soprattutto se si considera l'aumento dell'incidenza di queste condizioni. Inoltre, visto l'effetto positivo nei pazienti con disturbo depressivo maggiore, è auspicabile che l'intervento possa diventare benefico

per coloro che sono a rischio o hanno ricevuto una diagnosi di disturbi neuropsichiatrici o neurodegenerativi che condividono meccanismi patofisiologici simili.

Conclusione

Negli ultimi decenni la ricerca clinica e preclinica ha indagato e approfondito l'interazione tra cervello e intestino e l'inserimento del microbiota intestinale all'interno della comunicazione bidirezionale tra di essi esistente. Le scoperte relative alle molteplici segnalazioni che vengono continuamente trasmesse tra i due sistemi hanno inevitabilmente fornito preziose informazioni per una migliore comprensione del funzionamento corporeo. Inoltre, l'individuazione della dimensione e della complessità del profilo microbico enterico ha imposto la necessità di rivedere molti concetti relativi alla salute e alla malattia, così come gli aspetti emotivi, cognitivi e comportamentali manifestati dall'animale e dall'uomo.

Al momento, le conoscenze ad oggi disponibili indicano che l'asse cerebro-intestinale si sviluppa entro canali di comunicazione che coinvolgono segnali neurali, endocrini, nutritivi e immunologici afferenti ed efferenti tra il sistema nervoso centrale e il sistema gastrointestinale (Romijn et al., 2008). Inserendosi in questa variegata interazione, il microbiota impone la sua influenza tanto nella condizione di salute, quanto in quella di disagio fisiologico e psicologico, così come anche nella malattia.

Un potere assolutamente determinante in questa dinamica viene sicuramente assunto dallo stress: alla base di diversi disturbi cerebro-intestinali o, più in piccolo, di reazioni somatiche atipiche, è stata spesso rintracciata una risposta iperattiva allo stress a livello cerebrale, con la conseguente manifestazione di una perturbazione dell'equilibrio intestinale e microbico che si traduce nella contrazione di sintomi quali per esempio nausea, dolore, diarrea, vomito o disagio generale (Mayer, 2000). Sono diverse le condizioni patologiche legate a deficit nel SNC che presentano una comorbidità di sintomi gastrointestinali, così come non mancano, dall'altra, malattie puramente organiche spesso caratterizzate dalla co-occorrenza di sintomi appartenenti allo spettro psicologico.

Uno dei principali meccanismi proposti alla base delle alterazioni indotte dallo stress è il fenomeno del *leaky gut*, ovvero un aumento della permeabilità della barriera intestinale con la successiva diffusione di uno stato infiammatorio. Quest'ultimo tende ad

attivarsi ed esaurirsi a livello sistemico, ma può accadere che si estenda ad altri organi, al flusso sanguigno e al nervo vago, giungendo in alcune peculiari condizioni fino al cervello, come è stato evidenziato nei disturbi neurodegenerativi.

L'influenza del microbiota è stata rilevata nel corso dell'intera esistenza dell'organismo. Le prime tracce si osservano già durante la fase di vita prenatale, un periodo estremamente delicato in cui, accanto alla formazione di un microbiota precursore, lo sviluppo cerebrale affronta processi critici.

Si è visto, inoltre, che esiste un'interazione tra le traiettorie di sviluppo neurologico e microbiotico: si tratta di due percorsi paralleli con finestre di vulnerabilità simili. Durante le fasi critiche della maturazione neurale si interfaccia in maniera preponderante il rischio d'insorgenza di disordini di vario tipo, dai disturbi del neurosviluppo durante l'infanzia ai disturbi psichiatrici durante l'adolescenza e neurodegenerativi nel corso dell'invecchiamento (Borre et al., 2014a). Influenze degne di nota in questa dinamica di interazione derivano dai fattori ambientali che si presentano alla società nella sua configurazione odierna: in vista dei cambiamenti del profilo microbiotico intestinale e delle trasformazioni nella dieta, nello stile di vita e nell'approccio alla salute avvenute negli ultimi secoli, è stata proposta un'ottica che ha messo in risalto la relazione tra queste variabili e il microbiota e le relative ripercussioni sul benessere dell'individuo.

La prevalenza di disturbi mentali, malattie neurologiche e disturbi del neurosviluppo è in costante aumento, così come i cambiamenti nel microbiota commensale umano. Purtroppo, per molte di queste condizioni è lacunare la conoscenza relativa ai fattori scatenanti e alle possibili strategie d'intervento, tuttavia lo studio del coinvolgimento dei batteri intestinali nell'eziologia e nella patofisiologia si fa sempre più approfondito, con evidenze eterogenee tra i disturbi.

Particolare attenzione è stata rivolta ai disturbi dello spettro autistico. A spingere la ricerca in questa direzione d'indagine è stata la rilevazione di disturbi gastrointestinali in comorbidità, spesso frequente negli individui con diagnosi di questo tipo. Inoltre, in diversi studi è stata osservata una disfunzione del sistema immunitario e un aumento della permeabilità intestinale, insieme ad alterazioni significative della composizione microbiotica enterica rispetto ai controlli sani (Cryan et al., 2019; Vuong & Hsiao, 2017). Il modello animale di attivazione immunitaria materna ha determinato un decisivo passo in avanti nella ricerca: è stato visto che l'induzione di infezione in femmine di ratto incinte

si traduce nella prole attraverso manifestazioni comportamentali ascrivibili all'autismo e compromissioni intestinali e della microflora. Il trasferimento di questi deficit in topi di controllo in seguito a trapianto del microbiota ha suggerito con forza un ruolo centrale dei batteri intestinali nell'insorgenza dei sintomi, e la remissione rilevata in seguito alla somministrazione di un probiotico ne ha rimarcato l'evidenza (Hsiao et al., 2013). Altri studi condotti su animali privi di germi hanno confermato il coinvolgimento nella socievolezza, dimostrando che l'assenza di microbiota si ripercuote sul comportamento sociale (Desbonnet et al., 2014).

La ricerca ha rivolto la propria attenzione anche alle malattie neurodegenerative. In vista dei cambiamenti che si verificano durante l'invecchiamento a livello del microbiota, della barriera intestinale ed ematoencefalica, così come del sistema immunitario, si crede che l'età sia un fattore chiave per l'esordio di questi disturbi (Westfall et al., 2017; Quigley, 2017). È stato evidenziato che la microflora enterica, in particolar modo quando è in una fase di disbiosi, ha il potere di influenzare il progresso della malattia neurologica, andandone a scaturire persino l'insorgenza.

Sono molteplici le fonti della letteratura che sostengono vi sia un'alterazione dell'asse HPA nei disturbi psichiatrici legati all'ansia e alla depressione e che questa sia associata ad alti livelli di cortisolo e di mediatori dell'infiammazione che determinano uno stato pro-infiammatorio. Conseguentemente alla natura bidirezionale dell'interazione tra microbiota intestinale, intestino e cervello, ne deriva non solo che la microflora può contribuire a incrementare l'infiammazione e il livello di cortisolo in circolo, ma anche che lo stato infiammatorio può indurre alterazioni nel microbiota tramite effetti dannosi sulla salute gastrointestinale (Foster & Neufeld, 2013; Moloney et al., 2014; Simpson et al., 2021).

Una visione integrativa e moderna dei disturbi cerebrali classici come condizioni dell'intero organismo che riconosca un ruolo importante per il tratto gastrointestinale può portare alla realizzazione di strategie che prendono di mira il microbiota enterico per fornire opzioni terapeutiche nuove per diverse condizioni, soprattutto quelle per cui è ad ora assente un trattamento risolutivo o comunque sufficientemente efficace nell'attenuazione dei sintomi. Sembra che questo campo di indagine sia pronto per essere approfondito nei prossimi anni, rivolgendosi principalmente verso l'uso dei probiotici.

In generale, i risultati attualmente disponibili risentono di diversi limiti, primo fra tutti la netta preponderanza di studi preclinici e la scarsità di studi clinici. Ciò impone la necessità di un atteggiamento cautelare nei confronti delle osservazioni effettuate, derivata dall'evidente inadeguatezza dei sistemi animali nell'essere utilizzati come modello per l'essere umano, in particolar modo nel campo di ricerca relativo alla salute mentale e al comportamento.

Molti studi condotti sull'uomo sono tutt'ora in contrasto con alcune evidenze ottenute, e non mancano anche in questo caso limitazioni che ne inficiano la validità. Nell'ambito dell'uso dei probiotici sono stati spesso ottenuti dati incoraggianti, al punto da determinare ormai un diffuso riferimento ad una nuova terapia psicobiotica, ma è purtroppo frequente la mancanza di gruppi di controllo, l'utilizzo di piccoli campioni e la natura correlazionale di alcune osservazioni.

In aggiunta, è opportuno evidenziare come le scoperte relative al coinvolgimento del microbiota nelle espressioni di salute e di malattia, per quanto stimolanti e promettenti, non hanno ancora portato ad una chiara conoscenza dei meccanismi sottostanti. Sebbene sembrino esserci finestre critiche nello sviluppo neurologico e del microbiota, i processi alla base di questi effetti rimangono da chiarire.

In conclusione, è chiaro che l'individuazione della capacità del microbiota di comunicare con il cervello ha determinato l'avvento di una nuova visione delle condizioni di salute e di malattia nell'uomo, che si è inevitabilmente tradotto in intriganti opportunità di approfondimento, diagnosi e risoluzione. Svelare ciò che sfugge migliorerà la nostra conoscenza dell'eziologia dei disturbi psichiatrici e dello sviluppo neurologico, consentendo l'identificazione di biomarcatori di disfunzione e di nuove opportunità per lo sviluppo di interventi terapeutici.

Bibliografia

- Adams, J. B., Johansen, L. J., Powell, L. D., Quig, D., & Rubin, R. A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC gastroenterology*, *11*(1), 1-13.
- Agahi, A., Hamidi, G. A., Daneshvar, R., Hamdieh, M., Soheili, M., Alinaghypour, A., ... & Salami, M. (2018). Does severity of Alzheimer's disease contribute to its responsiveness to modifying gut microbiota? A double blind clinical trial. *Frontiers in neurology*, 662.
- Akbari, E., Asemi, Z., Daneshvar Kakhaki, R., Bahmani, F., Kouchaki, E., Tamtaji, O. R., ... & Salami, M. (2016). Effect of probiotic supplementation on cognitive function and metabolic status in Alzheimer's disease: a randomized, double-blind and controlled trial. *Frontiers in aging neuroscience*, *8*, 256.
- American Psychiatric Association (2013). *Manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali – Quinta edizione. DSM-5. Tr.it.*
- Anderson, S. C., Cryan, J. F., & Dinan, T. (2017). *The psychobiotic revolution: mood, food, and the new science of the gut-brain connection*. National Geographic Books.
- Bastiaanssen, T. F., Cusotto, S., Claesson, M. J., Clarke, G., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2020). Gutted! Unraveling the role of the microbiome in major depressive disorder. *Harvard Review of Psychiatry*, *28*(1), 26.
- Belzung, C., & Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural brain research*, *125*(1-2), 141-149.
- Benarroch, E. E. (1993, October). The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 68, No. 10, pp. 988-1001). Elsevier.
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., ... & Collins, S. M. (2011). The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*, *141*(2), 599-609.
- Bercik, P., Verdu, E. F., Foster, J. A., Macri, J., Potter, M., Huang, X., ... & Collins, S. M. (2010). Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. *Gastroenterology*, *139*(6), 2102-2112.
- Berdoy, M., Webster, J. P., & Macdonald, D. W. (2000). Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *267*(1452), 1591-1594.

- Black, C. J., Thakur, E. R., Houghton, L. A., Quigley, E. M., Moayyedi, P., & Ford, A. C. (2020). Efficacy of psychological therapies for irritable bowel syndrome: systematic review and network meta-analysis. *Gut*, *69*(8), 1441-1451.
- Blaser, M. J. (2016). Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science*, *352*(6285), 544-545.
- Borre, Y. E., Moloney, R. D., Clarke, G., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014b). The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms & therapeutic potential. *Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease*, 373-403.
- Borre, Y. E., O'Keeffe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014a). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in molecular medicine*, *20*(9), 509-518.
- Braak, H., de Vos, R. A., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2006). Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience letters*, *396*(1), 67-72.
- Buffington, S. A., Di Prisco, G. V., Auchtung, T. A., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., & Costa-Mattioli, M. (2016). Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell*, *165*(7), 1762-1775.
- Chaidez, V., Hansen, R. L., & Hertz-Picciotto, I. (2014). Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. *Journal of autism and developmental disorders*, *44*(5), 1117-1127.
- Chételat, G., La Joie, R., Villain, N., Perrotin, A., de La Sayette, V., Eustache, F., & Vandenberghe, R. (2013). Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer's disease. *NeuroImage: Clinical*, *2*, 356-365.
- Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(11), 735-742.
- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews neuroscience*, *13*(10), 701-712.
- Cryan, J. F., & O'Mahony, S. M. (2011). The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterology & Motility*, *23*(3), 187-192.
- Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Cowan, C. S., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F., Boehme, M., ... & Dinan, T. G. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological reviews*.
- Dalton, A., Mermier, C., & Zuhl, M. (2019). Exercise influence on the microbiome-gut-brain axis. *Gut Microbes*, *10*(5), 555-568.
- Davis, D. G., Schmitt, F. A., Wekstein, D. R., & Markesbery, W. (1999). Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, *58*(4), 376-388.

- De Palma, G., Blennerhassett, P., Lu, J., Deng, Y., Park, A. J., Green, W., ... & Bercik, P. (2015). Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nature communications*, 6(1), 1-13.
- De Palma, G., Lynch, M. D., Lu, J., Dang, V. T., Deng, Y., Jury, J., ... & Bercik, P. (2017). Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Science translational medicine*, 9(379), eaaf6397.
- Derkinderen, P., Shannon, K. M., & Brundin, P. (2014). Gut feelings about smoking and coffee in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 29(8), 976-979.
- Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular psychiatry*, 19(2), 146-148.
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017a). The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterology Clinics*, 46(1), 77-89.
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017b). Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *The Journal of physiology*, 595(2), 489-503.
- Dinan, T. G., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biological psychiatry*, 74(10), 720-726.
- Drossman, A. (2006). Rome III The functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*, 130, 1377-1556.
- Engen, P. A., Green, S. J., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2015). The gastrointestinal microbiome: alcohol effects on the composition of intestinal microbiota. *Alcohol research: current reviews*, 37(2), 223.
- Finegold, S. M., Dowd, S. E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K. E., Wolcott, R. D., ... & Green III, J. A. (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, 16(4), 444-453.
- Finegold, S. M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M. L., Bolte, E., ... & Kaul, A. (2002). Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clinical Infectious Diseases*, 35(Supplement_1), S6-S16.
- Foster, J. A., & Neufeld, K. A. M. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences*, 36(5), 305-312.
- Foster, J. A., Rinaman, L., & Cryan, J. F. (2017). Stress & the gut-brain axis: regulation by the microbiome. *Neurobiology of stress*, 7, 124-136.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Goehler, L. E., Park, S. M., Opitz, N., Lyte, M., & Gaykema, R. P. (2008). Campylobacter jejuni infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. *Brain, behavior, and immunity*, 22(3), 354-366.

- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2011). Brain–gut–microbe communication in health and disease. *Frontiers in physiology*, 2, 94.
- Heintz-Buschart, A., Pandey, U., Wicke, T., Sixel-Döring, F., Janzen, A., Sittig-Wiegand, E., ... & Wilmes, P. (2018). The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Movement disorders*, 33(1), 88-98.
- Hernán, M. A., Takkouche, B., Caamaño-Isorna, F., & Gestal-Otero, J. J. (2002). A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 52(3), 276-284.
- Hill, J. M., Clement, C., Pogue, A. I., Bhattacharjee, S., Zhao, Y., & Lukiw, W. J. (2014). Pathogenic microbes, the microbiome, and Alzheimer's disease (AD). *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 127.
- Hollander, E., Bartz, J., Chaplin, W., Phillips, A., Sumner, J., Soorya, L., ... & Wasserman, S. (2007). Oxytocin increases retention of social cognition in autism. *Biological psychiatry*, 61(4), 498-503.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., ... & Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7), 1451-1463.
- Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214.
- Jašarević, E., Howerton, C. L., Howard, C. D., & Bale, T. L. (2015). Alterations in the vaginal microbiome by maternal stress are associated with metabolic reprogramming of the offspring gut and brain. *Endocrinology*, 156(9), 3265-3276.
- Kang, D. W., Adams, J. B., Coleman, D. M., Pollard, E. L., Maldonado, J., McDonough-Means, S., ... & Krajmalnik-Brown, R. (2019). Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- Kang, D. W., Adams, J. B., Gregory, A. C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., ... & Krajmalnik-Brown, R. (2017). Microbiota transfer therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*, 5(1), 1-16.
- Kelly, J. R., Borre, Y., O'Brien, C., Patterson, E., El Aidy, S., Deane, J., ... & Dinan, T. G. (2016). Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of psychiatric research*, 82, 109-118.
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), 927-939.
- Kramer, M. S., Aboud, F., Mironova, E., Vanilovich, I., Platt, R. W., Matush, L., ... & Promotion of Breastfeeding Intervention Trial (PROBIT) Study Group. (2008). Breastfeeding and child cognitive development: new evidence from a large randomized trial. *Archives of general psychiatry*, 65(5), 578-584.

- Lach, G., Schellekens, H., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2018). Anxiety, depression, and the microbiome: a role for gut peptides. *Neurotherapeutics*, *15*(1), 36-59.
- Li, Q., Han, Y., Dy, A. B. C., & Hagerman, R. J. (2017). The gut microbiota and autism spectrum disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*, 120.
- Liang, S., Wu, X., & Jin, F. (2018). Gut-brain psychology: rethinking psychology from the microbiota–gut–brain axis. *Frontiers in integrative neuroscience*, *12*, 33.
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature reviews neuroscience*, *10*(6), 434-445.
- Lyte, M., Varcoe, J. J., & Bailey, M. T. (1998). Anxiogenic effect of subclinical bacterial infection in mice in the absence of overt immune activation. *Physiology & behavior*, *65*(1), 63-68.
- Mailing, L. J., Allen, J. M., Buford, T. W., Fields, C. J., & Woods, J. A. (2019). Exercise and the gut microbiome: a review of the evidence, potential mechanisms, and implications for human health. *Exercise and sport sciences reviews*, *47*(2), 75-85.
- Marques, A. H., O'Connor, T. G., Roth, C., Susser, E., & Bjørke-Monsen, A. L. (2013). The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *Frontiers in neuroscience*, *7*, 120.
- Martin, C. R., Osadchiy, V., Kalani, A., & Mayer, E. A. (2018). The brain-gut-microbiome axis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, *6*(2), 133-148.
- Mayer, E. A. (2000). The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut*, *47*(6), 861-869.
- Mayer, E. A. (2011). Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(8), 453-466.
- Mayer, E. A. (2016). *La comunicazione mente-pancia*. (M. Faccia, Trad.). Edizioni Il Punto d'Incontro. (Opera originale pubblicata nel 2016).
- Mayer, E. A., Knight, R., Mazmanian, S. K., Cryan, J. F., & Tillisch, K. (2014b). Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *Journal of Neuroscience*, *34*(46), 15490-15496.
- Mayer, E. A., Padua, D., & Tillisch, K. (2014a). Altered brain-gut axis in autism: comorbidity or causative mechanisms?. *Bioessays*, *36*(10), 933-939.
- McEwen, B. S. (2012). Brain on stress: how the social environment gets under the skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(Supplement 2), 17180-17185.
- Mohajeri, M. H., La Fata, G., Steinert, R. E., & Weber, P. (2018). Relationship between the gut microbiome and brain function. *Nutrition reviews*, *76*(7), 481-496.
- Moloney, R. D., Desbonnet, L., Clarke, G., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). The microbiome: stress, health and disease. *Mammalian genome*, *25*(1), 49-74.
- Morais, L. H., Schreiber, H. L., & Mazmanian, S. K. (2021). The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(4), 241-255.

- Mulak, A., & Bonaz, B. (2015). Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, *21*(37), 10609.
- O'Sullivan, O., Cronin, O., Clarke, S. F., Murphy, E. F., Molloy, M. G., Shanahan, F., & Cotter, P. D. (2015). Exercise and the microbiota. *Gut microbes*, *6*(2), 131-136.
- O'Mahony, S. M., Marchesi, J. R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A. M., Quigley, E. M., ... & Dinan, T. G. (2009). Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biological psychiatry*, *65*(3), 263-267.
- Peirce, J. M., & Alviña, K. (2019). The role of inflammation and the gut microbiome in depression and anxiety. *Journal of neuroscience research*, *97*(10), 1223-1241.
- Quigley, E. M. (2017). Microbiota-brain-gut axis and neurodegenerative diseases. *Current neurology and neuroscience reports*, *17*(12), 1-9.
- Rao, M., & Gershon, M. D. (2016). The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, *13*(9), 517-528.
- Rhee, S. H., Pothoulakis, C., & Mayer, E. A. (2009). Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, *6*(5), 306-314.
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., ... & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial ecology in health and disease*, *26*(1), 26050.
- Romijn, J. A., Corssmit, E. P., Havekes, L. M., & Pijl, H. (2008). Gut-brain axis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *11*(4), 518-521.
- Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., ... & Mazmanian, S. K. (2016). Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell*, *167*(6), 1469-1480.
- Sandler, R. H., Finegold, S. M., Bolte, E. R., Buchanan, C. P., Maxwell, A. P., Väisänen, M. L., ... & Wexler, H. M. (2000). Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *Journal of child neurology*, *15*(7), 429-435.
- Sarkar, A., Lehto, S. M., Harty, S., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Burnet, P. W. (2016). Psychobiotics and the manipulation of bacteria-gut-brain signals. *Trends in neurosciences*, *39*(11), 763-781.
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., ... & Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, *30*(3), 350-358.
- Selye H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 1998; *10*(2), 230-231.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, *164*(3), 337-340.

- Simpson, C. A., Diaz-Arteche, C., Eliby, D., Schwartz, O. S., Simmons, J. G., & Cowan, C. S. (2021). The gut microbiota in anxiety and depression—A systematic review. *Clinical psychology review*, *83*, 101943.
- Smith, K. S., Greene, M. W., Babu, J. R., & Frugé, A. D. (2021). Psychobiotics as treatment for anxiety, depression, and related symptoms: a systematic review. *Nutritional neuroscience*, *24*(12), 963-977.
- Sochocka, M., Donskow-Łysoniewska, K., Diniz, B. S., Kurpas, D., Brzozowska, E., & Leszek, J. (2019). The gut microbiome alterations and inflammation-driven pathogenesis of Alzheimer's disease—a critical review. *Molecular neurobiology*, *56*(3), 1841-1851.
- Spielman, L. J., Gibson, D. L., & Klegeris, A. (2018). Unhealthy gut, unhealthy brain: The role of the intestinal microbiota in neurodegenerative diseases. *Neurochemistry international*, *120*, 149-163.
- Stilling, R. M., & Cryan, J. F. (2016). Host response: a trigger for neurodegeneration?. *Nature Microbiology*, *1*(8), 1-2.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X. N., ... & Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *The Journal of physiology*, *558*(1), 263-275.
- Svensson, E., Horváth-Puhó, E., Thomsen, R. W., Djurhuus, J. C., Pedersen, L., Borghammer, P., & Sørensen, H. T. (2015). Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Annals of neurology*, *78*(4), 522-529.
- Teichman, E. M., O'Riordan, K. J., Gahan, C. G., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2020). When rhythms meet the blues: circadian interactions with the microbiota-gut-brain axis. *Cell Metabolism*, *31*(3), 448-471.
- Thaiss, C. A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A. C., ... & Elinav, E. (2014). Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, *159*(3), 514-529.
- Van Oudenhove, L., Levy, R. L., Crowell, M. D., Drossman, D. A., Halpert, A. D., Keefer, L., ... & Naliboff, B. D. (2016). Biopsychosocial aspects of functional gastrointestinal disorders: how central and environmental processes contribute to the development and expression of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*, *150*(6), 1355-1367.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., ... & Gewirtz, A. T. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*, *328*(5975), 228-231.
- Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Green, S. J., Engen, P. A., & Keshavarzian, A. (2016). Circadian rhythm and the gut microbiome. *International review of neurobiology*, *131*, 193-205.
- Vuong, H. E., & Hsiao, E. Y. (2017). Emerging roles for the gut microbiome in autism spectrum disorder. *Biological psychiatry*, *81*(5), 411-423.

- Wang, J., Gu, B. J., Masters, C. L., & Wang, Y. J. (2017). A systemic view of Alzheimer disease—insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nature reviews neurology*, *13*(10), 612-623.
- Wang, Y., & Kasper, L. H. (2014). The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain, behavior, and immunity*, *38*, 1-12.
- Weltens, N., Iven, J., Van Oudenhove, L., & Kano, M. (2018). The gut–brain axis in health neuroscience: implications for functional gastrointestinal disorders and appetite regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1428*(1), 129-150.
- Westfall, S., Lomis, N., Kahouli, I., Dia, S. Y., Singh, S. P., & Prakash, S. (2017). Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cellular and molecular life sciences*, *74*(20), 3769-3787.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., ... & Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, *334*(6052), 105-108.
- Yatsunenکو, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., ... & Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *nature*, *486*(7402), 222-227.