

MARCATORI DI MALATTIA

INTERAZIONE TRA GLI ACIDI BILIARI E IL MICROBIOTA INTESTINALE: IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE

Reciprocal interactions between bile acids and intestinal microbiota: pathophysiological implications

MARCO BUSNELLI, STEFANO MANZINI, CINZIA PAROLINI, GIULIA CHIESA*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano***SUMMARY**

The microbiota and the genes that comprise its microbiome play a key role in human pathophysiology. Host-microbe interactions affect metabolism, immunity, behavior and development. Alterations in the intestinal microbiota composition are associated with a number of diseases, ranging from obesity and inflammatory diseases to neurodevelopmental disorders and physiological abnormalities.

The gut microbiota not only facilitates harvesting of nutrients and energy from the ingested food, but also *convert* dietary molecules into signaling metabolites to communicate with the host.

One such class of metabolites, bile acids, is produced in the liver from enzymatic oxidation of cholesterol and is metabolized in the intestine by the gut microbiota. Bile acids function both as detergents that facilitate digestion and absorption of dietary lipids, and as hormones that act systemically via several receptors and regulate numerous metabolic pathways in the host. Conversely, bile acids can modulate gut microbial composition both directly, owing to their detergent properties on bacterial membranes, and indirectly, through activation of specific genes in the small intestine. Thus, targeting the interplay between microbiota, bile acids, and bile acid receptor signaling seems to represent a promising avenue for the treatment of metabolic diseases. However, much more research is needed in order to reach a deeper understanding of the complex crosstalk between the gut microbiota and the human host.

Keywords: *bile acids, microbiota, intestine, cholesterol.*

Indirizzo per la corrispondenza

Marco Busnelli
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e
Biomolecolari,
Università degli Studi di Milano
E-mail: marco.busnelli@gmail.com

Introduzione

Il numero delle ricerche scientifiche nelle quali si dimostra che il microbiota intestinale è in grado di influenzare la fisiopatologia dell'organismo ospite, uomo incluso, è in costante aumento. Il microbiota intestinale è un consorzio costituito prin-

cialmente da batteri, ma anche da virus, funghi e archea. L'abbondanza di questi microrganismi aumenta progressivamente al procedere nel tratto gastrointestinale, raggiungendo la concentrazione massima nel colon. Una rassegna pubblicata in precedenza su questa rivista (1) spiega in modo esaustivo quali siano i fattori che determinano la composizione del microbiota e gli effetti che quest'ultimo ha sull'insorgenza di aterosclerosi, concentrandosi in modo particolare sulla possibilità di modulare la composizione microbica attraverso l'utilizzo di probiotici.

In questo articolo ci limiteremo a ricordare che il numero di batteri ospitati nell'intestino dell'uomo è dieci volte superiore al numero di cellule che compongono l'intero organismo umano. In termini di peso, i batteri nel nostro intestino pesano all'incirca un chilogrammo e il 60% del contenuto delle nostre feci è rappresentato da batteri (2). In aggiunta a questo, il patrimonio genetico dei batteri che popolano l'intestino, il microbioma, include un numero di geni oltre cento volte superiore rispetto al patrimonio genetico umano (3, 4).

Dopo i primi riscontri sperimentali nei quali è stato osservato che la presenza del microbiota intestinale è in grado di regolare l'accumulo di tessuto adiposo corporeo e il bilancio energetico dell'organismo (5), si è compreso che questo rilevante consorzio di microrganismi è in grado di influenzare anche la maturazione e l'omeostasi del sistema immunitario (6), proteggere dalla colonizzazione di patogeni opportunisti (7), determinare crescita e maturazione degli enterociti (8), modulare l'angiogenesi, le funzioni endocrine intestinali (9, 10) e lo sviluppo del sistema nervoso enterico (11), fermentare fibre che sarebbero indigeribili da parte dell'ospite umano (12), sintetizzare vitamine (13), metabolizzare tossine e sostanze carcino-

gene assunte con la dieta (14), influenzare il comportamento agendo sulla sintesi di neurotrasmettitori (15).

In generale, il microbiota intestinale possiede un potenziale elevato nel sintetizzare composti bioattivi agendo su molecole di origine endogena o dietetica.

Questa rassegna intende focalizzarsi in particolare sull'interazione tra il microbiota intestinale e due classi di steroidi:

- 1) il colesterolo, assunto con la dieta o prodotto attraverso la sintesi endogena;
- 2) gli acidi biliari, sintetizzati nel fegato a partire da colesterolo e successivamente escreti nell'intestino.

Metabolismo del colesterolo da parte del microbiota intestinale

L'uomo assume con la dieta circa 400 mg/die di colesterolo, ma solo il 50% viene assorbito nell'intestino tenue. La quota di colesterolo dietetico non assorbita, sommata al colesterolo in arrivo con la bile, a quello derivante dal continuo ricambio degli enterociti e a quello escretato direttamente nel lume intestinale mediante la cosiddetta *Trans-Intestinal Cholesterol Excretion* (TICE), determina un contenuto di circa 1 g/die di colesterolo nelle feci (2). Il colesterolo che giunge nell'intestino viene metabolizzato dai batteri presenti nel lume: questi riducono il colesterolo a coprostanolo e, in minima quantità, a coprostanone (*Figura 1*). Il coprostanolo, essendo scarsamente assorbibile da parte degli enterociti, favorisce l'eliminazione del colesterolo dall'organismo e conseguentemente contribuisce a ridurre i livelli plasmatici di colesterolo.

Nell'uomo, la maggior parte dei soggetti converte con alta efficienza (circa 100%) il colesterolo a coprostanolo, mentre una quota ridotta della popolazione converte il colesterolo in coprostanolo

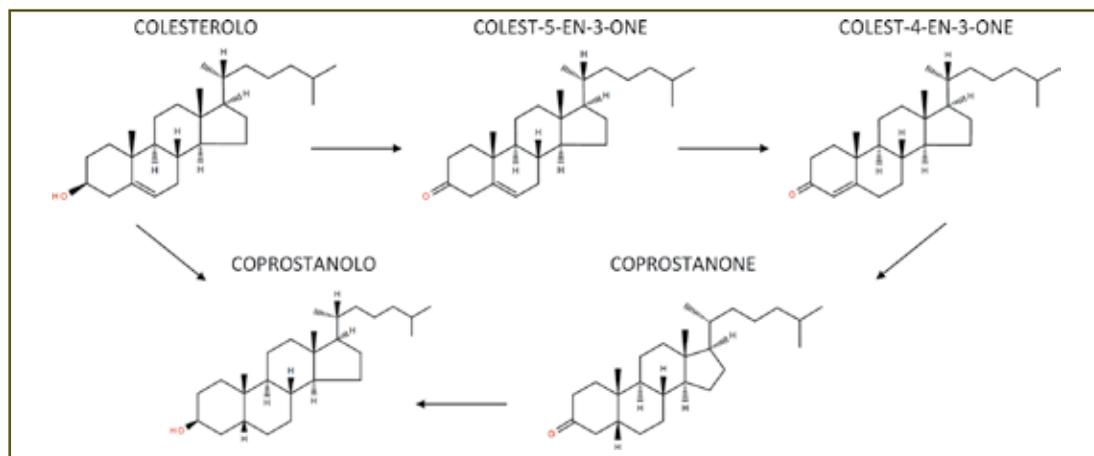


Figura 1 - Modalità di conversione, diretta e indiretta, del colesterolo a dare coprostanolo da parte del microbiota intestinale.

con scarsa efficienza (< del 30%) (16). La differente capacità di produrre coprostanolo non dipende da sesso ed età del soggetto, quanto piuttosto dall'abbondanza di batteri intestinali dotati di attività colesterolo-riducente (occorrono almeno 10^6 batteri/g feci per un'efficiente conversione) (16). A conferma di ciò, ratti privi di microbiota intestinale presentano nelle loro feci solamente colesterolo immodificato, segno che la sintesi di coprostanolo dipende integralmente dai batteri presenti nel colon (17). Per questo motivo, diversi studi si sono concentrati sull'identificazione di batteri dotati degli enzimi necessari alla biotrasformazione di colesterolo in coprostanolo e questo ha consentito di individuare diversi ceppi, tra i quali *Bifidobacteria* e *Lactobacilli*, che potrebbero contribuire alla riduzione della colesterolemia (1, 18-20).

Regolazione della sintesi di acidi biliari da parte del microbiota

Gli acidi biliari sono prodotti solubili del catabolismo del colesterolo che, al contrario, è altamente insolubile in acqua (Figura 2).

Gli acidi biliari sono molecole anfipatiche e in soluzione acquosa possiedono:

- 1) una funzione emulsionante che promuove la frammentazione dei grassi di origine alimentare in minuscole micelle;
- 2) una funzione idrotropica che favorisce l'assorbimento intestinale di acidi grassi, monogliceridi, colesterolo e vitamine liposolubili.

La sintesi degli acidi biliari primari avviene solo a livello epatico, è complessa e richiede diversi passaggi, catalizzati da almeno 17 enzimi (21).

Il primo passaggio nella sintesi di queste molecole consiste nella 7α -idrossilazione del colesterolo, catalizzata dall'enzima 7α -idrossilasi (CYP7A1). La via metabolica iniziata da CYP7A1 è considerata la via classica o "neutra" della sintesi degli acidi biliari. Esiste anche una via alternativa detta "acida" che prevede l'idrossilazione del colesterolo in C27 per mezzo dell'enzima mitocondriale sterolo 27-idrossilasi (CYP27A1). Gli acidi biliari intermedi prodotti da CYP27A1 sono successivamente idrossilati in posizione C7 dall'enzima ossisterolo 7α -idrossilasi (CYP7B1) (22) (Figura 3).

La via di sintesi alternativa contribuisce alla sintesi di acidi biliari per il 25% nel

topo, ma solo per il 6% nell'uomo. Il gruppo idrossile in C3 nella molecola di colesterolo deve cambiare orientamento durante la trasformazione ad acidi biliari (da orientamento β ad α) e questa reazione è catalizzata dall'enzima 3 β -idrossi- Δ^5 -C27-steroidi ossidoreduttasi (HSD3B7). A seguito dell'azione di HSD3B7, gli intermedi procedono lungo due vie metaboliche che portano ad acido colico e acido chenodesossicolico come prodotti finali.

Mentre la via di sintesi alternativa genera principalmente acido chenodesossicolico, la via classica origina sia acido chenodesossicolico, sia acido colico. Il rapporto tra le quantità di questi due acidi biliari primari dipende dall'attività della sterolo 12 α -idrossilasi (CYP8B1) che è richiesta per la sintesi di acido colico (23).

Il microbiota intestinale è in grado di regolare l'espressione di alcuni tra questi enzimi, inclusi CYP7A1, CYP7B1, and CYP27A1, ma non quella di CYP8B1 (24) (Figura 3).

Nell'uomo, gli acidi biliari primari, acido colico e chenodesossicolico, sono prodotti nel fegato e vengono secreti nella bile, principalmente sotto forma di sali sodici, coniugati con gli amminoacidi taurina e glicina. In aggiunta all'acido colico e all'acido chenodesossicolico, topi e ratti sintetizzano anche acido α -muricolico, β -muricolico e acido ursodesossicolico quali acidi biliari primari.

Anche la sintesi di taurina così come quella del primo dei due enzimi necessari per la coniugazione degli acidi biliari SLC27A5 (*Bile acid:CoA synthetase*), sono regolate dal microbiota (24).

Gli acidi biliari coniugati vengono accumulati nella cistifellea fino al rilascio nel duodeno dopo l'ingestione di un pasto, dove formano micelle con i grassi assunti con la dieta.

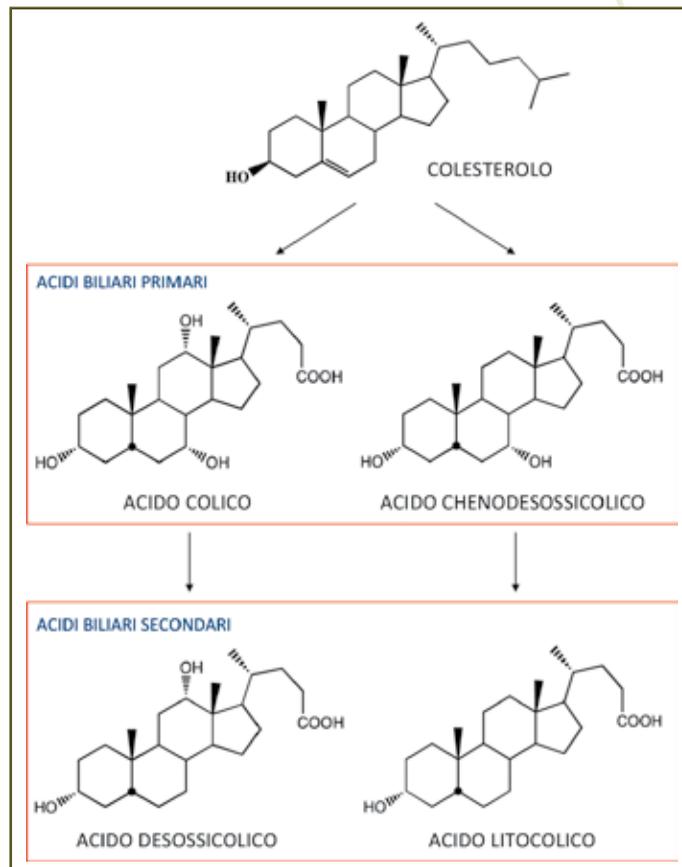


Figura 2 - Formule di struttura del colesterolo, degli acidi biliari primari e degli acidi biliari secondari nell'uomo.

Circa il 95% degli acidi biliari è riassorbito dalla mucosa intestinale a livello del digiuno prossimale e del colon con un meccanismo passivo. Nell'ileo invece, sono riassorbiti in particolar modo i composti coniugati grazie a un meccanismo di assorbimento attivo mediato dal trasportatore ASBT (*Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter*). Dopo il passaggio attraverso la mucosa, i sali biliari si staccano dai lipidi passando nei vasi portali, mentre i grassi entrano nei vasi linfatici. A livello del fegato gli acidi biliari sono prelevati dal sangue nei sinusoidi e riassorbiti dagli epatociti. Questo processo prende il nome di circolo enteroepatico.

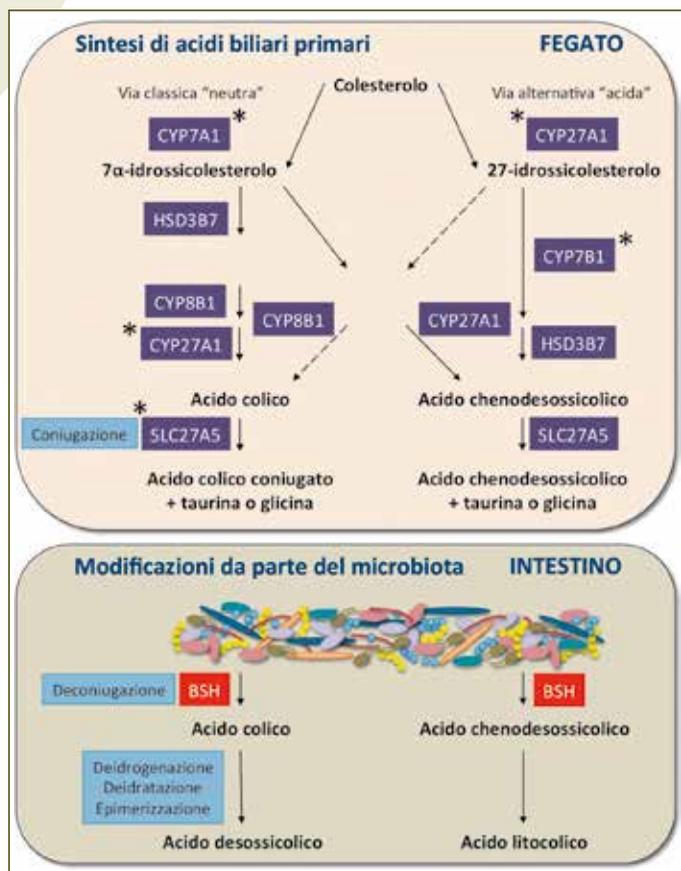


Figura 3 - Rappresentazione schematica della sintesi degli acidi biliari primari nel fegato e degli acidi biliari secondari nell'intestino. Gli asterischi indicano gli enzimi o i passaggi regolati dal microbiota. BSH, idrolasi degli acidi biliari.

Evidenze sperimentali hanno mostrato che la mucosa ileale di ratti privi di microbiota possiede una aumentata capacità di assorbire acido colico coniugato con taurina rispetto a quella di ratti dotati di flora intestinale (25).

Questa osservazione, insieme alla scoperta che l'espressione di ASBT è regolata dal microbiota, fornisce evidenze che il microbiota intestinale è in grado di regolare sia la sintesi di acidi biliari, sia la loro ricaptazione a livello intestinale (24).

Metabolismo degli acidi biliari da parte del microbiota intestinale

Nell'intestino, il microbiota trasforma gli acidi biliari primari, di origine epatica, in acidi biliari secondari. Gli acidi biliari coniugati escreti nella bile vengono in parte deconiugati, in parte deidrossilati in posizione C7, e in parte ridotti. La metabolizzazione degli acidi biliari da parte del microbiota intestinale aumenta la diversificazione e l'idrofobicità del pool di acidi biliari, e ne facilita l'eliminazione attraverso le feci.

La deconiugazione degli acidi biliari, vale a dire la rimozione di glicina e taurina, ne previene la ricaptazione nell'intestino tenue da parte del trasportatore ASBT. Questa reazione dipende interamente dall'attività dei batteri intestinali dotati dell'enzima idrolasi degli acidi biliari (BSH, *Bile salt hydrolase*). Tale enzima è espresso in moltissimi batteri che popolano il tratto digerente dell'uomo, in particolare in Lactobacilli e Bifidobacteria (26), e garantisce loro una maggiore resistenza alla tossicità dovuta agli acidi biliari (26). In aggiunta a questo, la deconiugazione fornisce atomi di carbonio, azoto e zolfo, necessari ai batteri per il loro metabolismo (27).

Gli acidi biliari deconiugati che non sono assorbiti a livello dell'ileo via ASBT raggiungono il colon, dove sono sottoposti a deidrossilazione in posizione C7. In questo modo si generano gli acidi biliari secondari: acido litocolico (da acido chenodesossicolico) e acido desossicolico (da acido colico).

Nel topo, la deidrossilazione in posizione C7 degli acidi biliari primari α -muricolico e β -muricolico risulta principalmente nella formazione di acido muridesossicolico. Nell'uomo, è stato inoltre osservato che il microbiota può generare acidi biliari secondari attraverso reazioni di isomerizzazione: in particolare, l'acido ursodesossico-

lico si forma in seguito ad isomerizzazione dell'acido chenodesossicolico da parte di *Clostridium absonum* (28).

Il processo di deidrossilazione richiede diverse reazioni condotte da batteri appartenenti ai generi *Clostridium* (cluster XIVa e XI) ed *Eubacterium*, a loro volta facenti parte del phylum Firmicutes (29, 30). Tale trasformazione da parte dei batteri è favorevole dal punto di vista energetico, tuttavia porta alla sintesi di acidi biliari secondari ancor più tossici nei confronti dei batteri stessi (27).

Gli acidi biliari secondari deconiugati possono essere riassorbiti in minima parte dalla parete intestinale mediante diffusione passiva; in questo modo entrano nella circolazione enteroepatica e in seguito fungono da molecole di segnale a livello sistemico nell'organismo ospite.

È interessante notare, a questo riguardo, che aumentati livelli di acido desossicolico sono stati associati a obesità e a una maggior predisposizione all'insorgenza di tumori epatici nel topo; questo supporta l'ipotesi di un ruolo fondamentale del microbiota nell'influenzare il metabolismo dell'ospite mediante la conversione degli acidi biliari (31).

Si deve comunque tenere in considerazione che il diverso profilo di acidi biliari tra uomini e topi può influenzare in modi differenti le vie di segnale attraverso l'interazione con recettori degli acidi biliari. Questo richiede di porre particolare attenzione quando si tratta di traslare risultati ottenuti nel topo all'uomo.

Gli acidi biliari modificano la composizione del microbiota intestinale

L'interazione tra il microbiota e gli acidi biliari non è unidirezionale. Quantità e composizione degli acidi biliari sembrano

essere due fattori importanti nel regolare il microbiota intestinale. È stato in precedenza mostrato, in modelli sperimentali, che un'ostruzione delle vie biliari tale da impedire il fluire degli acidi biliari dalla cistifellea al lume intestinale causa un'aumentata proliferazione di batteri nell'intestino tenue (32). Tale condizione può essere totalmente revertita dalla somministrazione di acidi biliari con la dieta, come dimostrato in un modello di cirrosi epatica, patologia caratterizzata da una ridotta secrezione di acidi biliari (33).

Un recente studio clinico condotto in soggetti controllo e pazienti affetti da cirrosi ha messo in correlazione la concentrazione di acidi biliari nelle feci con la composizione del microbiota intestinale. Stadi avanzati di malattia si associavano ad alterazioni importanti nella composizione del microbiota (disbiosi): era evidente una correlazione tra la diminuita quantità di acidi biliari rilasciati nel lume intestinale e una significativa riduzione dei batteri gram-positivi *Blautia* e *Ruminococcaceae*, che includono numerose specie dotate di attività deidrossilante in posizione C7 e quindi in grado di produrre acidi biliari secondari. Inoltre, diminuiti livelli di acidi biliari fecali si associavano a una aumentata presenza di batteri potenzialmente patogeni, in grado di indurre infiammazione, quali le *Enterobacteriaceae* (34).

È ormai noto che gli acidi biliari possiedono effetti antimicrobici diretti, dovuti all'azione detergente che esercitano sulle membrane batteriche (35), così come effetti indiretti, mediati dall'attivazione del recettore nucleare per gli acidi biliari FXR (*Farnesoid X Receptor*) (36).

La somministrazione orale di acido colico nei ratti risulta in alterazioni del microbiota a livello di phylum: i Firmicutes passano dal 54% dei ratti controllo al 98%. A livello di classe, i Clostridia passano dal

39% nei controlli al 70%; tra i Clostridia, il genus *Blautia* passa dall'8% dei controlli a oltre il 55% nei ratti che ricevono acido colico (37). *Blautia* include molte specie di Clostridium e Ruminococcus e altre specie con capacità di deidrossilare gli acidi biliari primari a dare acidi biliari secondari. Inoltre, l'assunzione di acidi biliari risulta in una significativa riduzione di Bacteroidetes e Actinobacteria. L'espansione dei Firmicutes si accompagna ad un aumento di mille volte nel numero di batteri in grado di modificare l'acido colico a dare acido desossicolico (30), che come agente antimicrobico è di un ordine di grandezza più potente dell'acido colico, a causa del suo potere detergente nei confronti delle membrane batteriche (35). Pertanto, ridotti livelli di acidi biliari nel lume intestinale favoriscono la proliferazione di batteri gram-negativi, tra i quali sono inclusi diversi patogeni. Aumentati livelli di acidi biliari nell'intestino favoriscono invece batteri gram-positivi appartenenti ai Firmicutes, in particolare i batteri in grado di modificare gli acidi biliari primari dell'ospite in acidi biliari secondari.

Da poco è stato dimostrato che l'attivazione del recettore nucleare FXR è in grado di influenzare la composizione del microbiota (38). Topi non esprimenti FXR (*Fxr*^{-/-}) alimentati con una dieta ad elevato contenuto di grassi mostrano un aumento nella percentuale di Firmicutes e una corrispondente diminuzione nella percentuale di Bacteroidetes rispetto a topi *wild-type* alimentati con la stessa dieta. Il profilo degli acidi biliari intestinali di topi *Fxr*^{-/-} è altrettanto alterato, mostrando livelli più elevati di acidi biliari primari (acido β -muricolico e acido β -muricolico coniugato con taurina), indice di una ridotta conversione ad acidi biliari secondari. L'accumulo di acidi biliari primari in

topi privi di FXR indica che il microbiota potrebbe avere scarsa capacità di metabolizzare gli acidi biliari in assenza di questo recettore (38).

Esiste una relazione dinamica tra gli acidi biliari e il microbiota che può essere modificata dal tipo di dieta, causando effetti benefici o nocivi sul metabolismo dell'organismo ospite. Topi alimentati con diete ad elevato contenuto di grassi ottenuti da due fonti differenti, grassi del latte o grassi polinsaturi, sono stati confrontati con topi alimentati con dieta priva di grassi. Le diete ad elevato contenuto di grassi aumentavano l'abbondanza relativa in Bacteroidetes e riducevano la percentuale di Firmicutes, indipendentemente da quale fosse la fonte lipidica. Tuttavia, i topi alimentati con grassi ottenuti dal latte evidenziavano un cambiamento nel profilo degli acidi biliari che era caratterizzato da aumentati livelli di acido colico coniugato con taurina e un'espansione di *Bilophila wadsworthia*, non osservati in topi alimentati con grassi polinsaturi (39). *Bilophila wadsworthia* è un membro dei Proteobacteria delta, necessita di acidi biliari per la propria crescita ed è stato associato all'insorgenza di infiammazione intestinale. A conferma di queste osservazioni, la proliferazione di *Bilophila wadsworthia* può essere ridotta alimentando i topi con diete arricchite in olio di pesce (quindi in omega 3) che sono in grado di modificare in modo cospicuo la composizione degli acidi biliari nella bile (40).

È ormai noto che il microbiota è in grado di metabolizzare la colina assunta con la dieta a dare trimetilammina (TMA). Questa, modificata dall'enzima epatico Monoossigenasi contenente Flavina 3 (FMO3) dell'ospite origina il metabolita pro-aterogeno trimetilammina-N-ossido (TMAO) (41, 42). Quello che qui deve essere sotto-

lineato è che l'espressione del gene FMO3 è regolata da FXR, come dimostrato da esperimenti nei quali topi wild-type e topi FXR^{-/-} sono stati trattati con ligandi di FXR e solo i primi mostravano una induzione nell'espressione di FMO3 e aumentati livelli di TMAO. In aggiunta a questo, è stato dimostrato che una dieta ricca in TMAO riduce il pool degli acidi biliari nel topo, alterando potenzialmente le vie di segnale mediate da FXR e di conseguenza il metabolismo dell'ospite (42).

Lasse microbiota-acidi biliari-recettori degli acidi biliari può modulare il metabolismo dell'ospite

Recentemente si è compreso che gli acidi biliari possono agire anche come ormoni in grado di influenzare la fisiologia e il metabolismo dell'intero organismo. Gli acidi biliari, metabolizzati dal microbiota a livello intestinale, entrano in parte nella circolazione sistemica raggiungendo una serie di organi bersaglio in aggiunta al fegato (38). Gli acidi biliari agiscono come ormoni in quanto fungono da ligandi naturali per un ampio pannello di recettori precedentemente ritenuti "orfani". Questi includono altri recettori nucleari oltre ad FXR, quali Pregnane X Receptor (PXR),

Vitamin D Receptor (VDR) e recettori accoppiati a proteine G quali TGR5, Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 (S1PR2), muscarinic receptor 2 (43).

Diversi acidi biliari possiedono affinità differenti nell'attivare i loro recettori (*Tabella 1*). Dato che il profilo degli acidi biliari di ogni soggetto dipende dal tipo di dieta e dalla composizione del microbiota intestinale, è immediatamente comprensibile quanto variegato sia il modo nel quale le vie di trasduzione del segnale regolate da questi recettori possono essere modulate.

Attraverso il metabolismo degli acidi biliari che andranno ad interagire con questi recettori, il microbiota è dunque in grado di influenzare diversi bersagli tra cui la fisiologia intestinale, il metabolismo lipidico (44), l'omeostasi del glucosio (45), la biosintesi degli acidi grassi, la formazione di tessuto adiposo bruno (46), la regolazione del sistema immunitario (47), e la sintesi stessa degli acidi biliari.

Consideriamo come esempio FXR, il principale regolatore dell'omeostasi degli acidi biliari (48). I due tessuti con l'espressione più elevata di FXR sono il fegato e l'ileo. Nel fegato, FXR quando attivato dal legame con acidi biliari, inibisce l'espressione del gene CYP7A1 (49). FXR però

Tabella 1 - Recettori attivati dal legame con acidi biliari. CDCA, acido chenodesossicolico; DCA, acido desossicolico; LCA, acido litocolico; CA, acido colico; T-DCA, acido deossicolico coniugato con taurina; T-LCA, acido litocolico coniugato con taurina; T-CA, acido colico coniugato con taurina. (Tabella modificata da ref. 30).

Recettore	Tipo	Acidi biliari agonisti
Farnesoid X Receptor	Nucleare	CDCA>LCA=DCA>CA
Pregnane X Receptor	Nucleare	LCA>DCA>CA
Vitamin D Receptor	Nucleare	LCA>DCA>CA
TGR5	Accoppiato a proteine G	DCA>LCA>CDCA>CA
Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2	Accoppiato a proteine G	Acidi biliari coniugati
Muscarinic Receptor 2	Accoppiato a proteine G	T-LCA>T-DCA>T-CA

Questionario di auto-apprendimento

- 1) Il microbiota intestinale:**
 - a) aumenta in concentrazione al procedere lungo l'intestino
 - b) è più abbondante nel colon
 - c) è costituito da batteri, virus, funghi e archea
 - d) tutte le risposte precedenti sono esatte
- 2) I roditori axenici:**
 - a) sono roditori Specific-Pathogen Free
 - b) sono privi di qualsiasi microorganismo nel loro corpo e sulle loro superfici
 - c) hanno uno sviluppo normale del sistema immunitario
 - d) tutte le risposte precedenti sono false
- 3) Gli acidi biliari secondari:**
 - a) sono prodotti nell'intestino dal microbiota
 - b) sono coniugati con taurina o glicina
 - c) sono prodotti nel fegato a partire da colesterolo
 - d) non sono tossici nei confronti del microbiota
- 4) La deconiugazione degli acidi biliari:**
 - a) riguarda solo la coniugazione con taurina ma non quella con glicina
 - b) avviene a livello sistemico
 - c) dipende dall'enzima batterico BSH
 - d) non dipende dall'azione del microbiota
- 5) Il colesterolo:**
 - a) viene convertito in acidi biliari primari nel colon
 - b) è più solubile in acqua degli acidi biliari primari
 - c) viene processato dai batteri presenti nel colon a dare coprostanolo
 - d) in assenza di microbiota viene trasformato in coprostanolo dall'ospite

(Risposte esatte: 1d; 2b; 3a; 4c; 5c)

può essere attivato dagli acidi biliari anche nell'ileo distale dove induce l'espressione di FGF19 (Fgf15 nel topo). FGF15/19 raggiunge il fegato attraverso il sangue portale e contribuisce ulteriormente all'inibizione di CYP7A1 (50). A questo riguardo, è stato dimostrato che gli acidi biliari primari coniugati con taurina agiscono come antagonisti naturali di FXR (24). Topi privi di microbiota presentano un accumulo di acido β -muricolico coniugato con taurina, una ridotta attivazione di FXR e un conseguente aumento nella sintesi di acidi biliari (24). Questo si verifica poiché l'acido β -muricolico coniugato con taurina non può essere metabolizzato in assenza di batteri intestinali. Al contrario, la presenza del microbiota intestinale riduce i livelli di acido β -muricolico coniugato, aumentando di conseguenza l'espressione di Fgf15 dovuta all'attivazione di FXR, e sopprimendo la sintesi di nuovi acidi biliari da parte di Cyp7a1 (24).

Conclusioni

È ormai noto che l'organismo umano offre ospitalità a centinaia di miliardi di microrganismi simbiotici nell'intestino così come sulle superfici corporee. L'interazione tra noi e il nostro microbiota è straordinariamente complessa ed è influenzata dalla composizione stessa del microbiota, dal nostro patrimonio genetico, da fattori dietetici e da altri fattori ambientali ai quali siamo esposti.

Il numero di lavori scientifici volti ad investigare il ruolo del microbiota nell'insorgenza di malattie cardiometaboliche è in costante crescita e particolare attenzione è stata rivolta all'interazione complessa e reciproca tra acidi biliari e microbiota intestinale.

Gli acidi biliari modulano la composizione del consorzio di microrganismi che

popolano il nostro intestino: ad esempio, un elevato contributo dietetico di grassi aumenta i livelli di acidi biliari nell'intestino fino a modificare in modo marcato la composizione del microbiota. Al tempo stesso è stato dimostrato che diversi microbiota intestinali possono modulare la composizione del pool di acidi biliari. Gli effetti dell'interazione tra microbiota e acidi biliari non sono tuttavia limitati a fegato e intestino. Agendo come ormoni, gli acidi biliari secondari prodotti dai batteri intestinali sono in grado di legare e attivare numerosi recettori a livello sistemico, influenzando la fisiopatologia dell'organismo ospite.

Il microbiota intestinale rappresenta quindi un ambito di ricerca innovativo e molto promettente; tuttavia, le sue potenzialità terapeutiche devono ancora essere comprese appieno.

La definizione di un semplice catalogo dei microrganismi che popolano l'intestino in diversi stati patologici, infatti, non è più sufficiente. Gli studi, di base e clinici, dovranno cercare di giungere alla comprensione dei molteplici meccanismi

molecolari alla base dell'interazione tra il microbiota e il metabolismo dell'organismo ospite.

Bullett points

- Il colesterolo che giunge nell'intestino viene metabolizzato dai batteri a dare coprostanolo che, essendo scarsamente assorbibile da parte degli enterociti, facilita l'eliminazione del colesterolo dall'organismo.
- Gli acidi biliari primari sono prodotti nel fegato, a partire dal colesterolo, seguendo due vie di sintesi, quella normale o "neutra" e quella alternativa o "acida".
- Nell'intestino, il microbiota trasforma gli acidi biliari primari di origine epatica in acidi biliari secondari, principalmente mediante reazioni di deconiugazione dagli amminoacidi taurina e glicina e di deidrossilazione.
- Quantità e profilo degli acidi biliari sono fattori importanti nel regolare la composizione dei batteri che vanno a costituire il microbiota intestinale.
- Gli acidi biliari possono agire anche come ormoni interagendo, a livello sistemico, con un ampio pannello di recettori nucleari e recettori accoppiati a proteine G.

RIQUADRO DI APPROFONDIMENTO: STUDIARE IL MICROBIOTA

L'uomo si è evoluto insieme ai microrganismi che popolano ogni ambiente terrestre, inclusi i diversi habitat presenti nel corpo umano. Tuttavia, fino a pochi decenni fa, sarebbe stato impensabile definire l'abbondanza e la complessità dei microrganismi che vivono in simbiosi con l'uomo. Prendendo in considerazione il caso specifico dei batteri che popolano l'intestino umano, lo studio del microbiota presentava due principali limitazioni:

l'approccio impiegato, poiché prevedeva l'utilizzo di colture specifiche per ogni singolo microrganismo;

l'intestino umano è colonizzato in gran parte da batteri anaerobi obbligati, pertanto era particolarmente difficile, se non impossibile, studiarli mediante l'impiego di colture.

Il balzo in avanti nello studio del microbiota è stato ottenuto grazie alla fusione di due approcci:

- 1) l'introduzione di tecniche di sequenziamento *high-throughput* ha permesso di definire la composizione del microbiota intestinale e di apprezzarne la complessità, in modo totalmente indipendente dalla preparazione di colture;
- 2) la realizzazione di studi di gnotobiologia, in cui si utilizzano topi o ratti privi di qualsiasi microrganismo nel loro corpo e sulle loro superfici, oppure colonizzati selettivamente da specie note allo sperimentatore, ha permesso di comprendere l'associazione tra differenti composizioni del microbiota e fisiopatologia dell'organismo ospite.

>>> seguito

Le metodiche indipendenti dall'uso di colture si basavano inizialmente sul sequenziamento del gene codificante per l'RNA ribosomale batterico 16S, che differisce tra le diverse specie batteriche e rappresenta per questo un comodo metodo di identificazione. In seguito la messa a punto di metodiche NGS (*Next-Generation Sequencing*) ha consentito di eseguire analisi ancora più informative, non più limitate al gene 16S rRNA ma in grado di sequenziare l'intero genoma delle specie batteriche. Il sequenziamento della totalità del contenuto genomico di origine microbica fornisce informazioni anche sul potenziale funzionale di un dato consorzio di microrganismi.

Il termine gnotobiologia deriva dal greco *gnotos* "conosciuto" e *bios* "vita". Per l'esecuzione di studi di questo tipo esistono diverse strategie, ma un punto di partenza comune è rappresentato dall'uso di topi o ratti axenici (o "*germ-free*"), privi di qualsiasi microorganismo, inclusi batteri, virus (ad eccezione dei retrovirus endogeni), funghi, protozoi e altri parassiti. Questi roditori non vanno confusi con i roditori SPF (*Specific-Pathogen Free*) che sono unicamente privi di microrganismi patogeni noti, ma possiedono una flora intestinale.

La generazione di roditori axenici, aventi qualsiasi genotipo, e il loro allevamento vengono condotti in isolatori che separano gli animali dal mondo esterno per tutto il tempo desiderato. I roditori axenici rappresentano un modello fondamentale in studi finalizzati a comprendere se e come il microbiota abbia un ruolo nello sviluppo di un particolare fenotipo. Non bisogna tuttavia dimenticare che, mancando della flora intestinale fin dalla nascita, questi animali presentano importanti alterazioni fisiologiche:

- un sistema immunitario immaturo;
- un turnover rallentato dell'epitelio intestinale;
- alterazioni nell'espressione genica intestinale;
- differenti esigenze nutrizionali (richiedono ad esempio diete arricchite in vitamina K, di solito prodotta dai batteri);
- un minore accumulo di tessuto adiposo;
- un ingrossamento marcato del ceco;
- una maggiore suscettibilità alle infezioni di agenti patogeni opportunisti. Un modo per ovviare a queste modificazioni è quello di trattare topi adulti normalmente dotati di microbiota intestinale, con opportune combinazioni di antibiotici per renderli axenici solo dopo lo sviluppo embrio-fetale e il parto.

I roditori axenici possono essere studiati come tali oppure essere colonizzati da una singola specie microbica di interesse, da "cocktail" di batteri a composizione nota, oppure ricevere un microbiota complesso mediante trapianto fecale. In questo ultimo caso, i donatori del microbiota possono appartenere alla stessa specie del ricevente o anche ad altre specie, uomo incluso.

Glossario

PROBIOTICI = Microorganismi vivi che, somministrati a uomini o animali, apportano un beneficio alla salute dell'ospite.

MICROBIOMA = L'insieme dei genomi di tutti i microrganismi che compongono un dato microbiota.

TICE = (Trans-Intestinal Cholesterol Excretion) via inducibile di eliminazione del colesterolo, alternativa alla produzione di acidi biliari, che consente l'escrezione del colesterolo plasmatico direttamente nel lume intestinale.

CYP7A1 = (Cholesterol 7 alpha-hydroxylase). Enzima limitante la via classica di sintesi degli acidi biliari; ossida il colesterolo a dare 7 α -idrossicolesterolo.

CYP27A1 = (Sterol 27-hydroxylase). Enzima che dà inizio alla via alternativa di sintesi degli acidi grassi introducendo un gruppo idrossilico in C27 della molecola di colesterolo a dare 27-idrossicolesterolo. Presente nella via classica, porta invece alla sintesi di acido 3 β -idrossicolestenoico.

- CYP7B1** = (Oxysterol 7-alpha-hydroxylase). Enzima della via alternativa di sintesi degli acidi biliari che sintetizza acido 3 β -7 α -diidrossi-colestenico.
- HSD3B7** = (3 β -hydroxy- Δ 5-C27-steroid oxidoreductase). Il gruppo idrossilico in C3 del colesterolo deve cambiare conformazione, o epimerizzare, da β ad α durante la sintesi degli acidi biliari. HSD3B7 catalizza l'ossidazione del 3 β -idrossile a 3-osso derivato.
- CYP8B1** = (Sterol 12-alpha-hydroxylase). Enzima che determina il rapporto di produzione tra acido colico e acido chenodesossicolico. Gli intermedi nella sintesi di acidi biliari che vengono metabolizzati da CYP8B1 vengono trasformati in acido colico, mentre quelli che non vengono interessati dall'azione di CYP8B1 diventano acido chenodesossicolico.
- SLC27A5** = (Bile acid:CoA synthetase). Enzima che contribuisce alla coniugazione degli acidi biliari con glicina o taurina. In particolare catalizza la prima fase di questo processo, vale a dire la conversione degli acidi biliari nei loro acil-CoA tioesteri.
- ASBT** = (Apical Sodium-dependent Bile-acid Transporter). Codificato dal gene SLC10A2, questo cotrasportatore media, a livello dell'ileo, l'uptake degli acidi biliari da parte dell'orletto a spazzola presente sulla superficie apicale degli enterociti.
- BSH** = (Bile Salt Hydrolase). Enzima espresso da vari batteri presenti nell'intestino tenue. Catalizza la deconiugazione degli acidi biliari primari coniugati con colina o taurina. Gli acidi biliari non più coniugati che si generano sono ulteriormente metabolizzati da parte dei batteri dotati di attività 7 α -deidrossilasica per dare acidi biliari secondari.
- DISBIOSI** = Uno squilibrio nella composizione e nella funzionalità del microbiota rispetto a quanto normalmente riscontrato in un organismo ospite. Uno stato di disbiosi si può associare ad alterazioni della risposta immunitaria, a suscettibilità a malattie infiammatorie, allergie e dismetabolismi.
- FXR** = (Farnesoid X Receptor). Recettore nucleare per gli acidi biliari, regolatore principale dell'omeostasi degli acidi biliari che vi si legano con differenti affinità.
- FMO3** = (Flavin-containing MonoOxygenase 3). Enzima epatico che catalizza la conversione della trimetilammina a trimetilammina-N-ossido. In aggiunta a questo sembra sia coinvolto nell'assorbimento intestinale di colesterolo, nella sintesi epatica di ossisteroli e di colesterolo esteri.
- TMAO** = (Trimethylamine-N-oxide). I cibi di origine animale sono ricchi di trimetilammina-N-ossido o dei suoi precursori colina (nelle uova) e carnitina (nella carne). TMAO può essere assorbita come tale a livello intestinale, mentre colina e carnitina vengono trasformate in trimetilammina (TMA) da parte del microbiota intestinale. Una volta assorbita, TMA raggiunge il fegato dove viene ossidata a dare TMAO da parte di FMO3.
- FGF15/19** = (Fibroblast Growth factor 15/19). Fgf15 e FGF19 si riferiscono rispettivamente al gene murino ed a quello umano. FGF15/19 è espresso dagli enterociti nell'ileo ed è indotto da FXR in risposta al riassorbimento di acidi biliari. Entrato nella circolazione portale, FGF15/19 raggiunge il fegato dove sopprime la sintesi di acidi biliari e la gluconeogenesi, promuove la sintesi di glicogeno e di proteine.

RIASSUNTO

Il microbiota e i geni che ne costituiscono il microbioma, vale a dire l'intero patrimonio genetico, hanno un ruolo rilevante nella fisiopatologia umana. Il metabolismo, lo sviluppo del sistema immunitario, il comportamento e lo sviluppo del sistema nervoso sono solo alcuni dei processi fisiologici che vengono influenzati dall'interazione tra il microbiota e il corpo umano che lo ospita. Alterazioni nella distribuzione delle specie che compongono il microbiota intestinale si associano ad una serie di stati patologici, inclusi obesità, patologie infiammatorie e anomalie dello sviluppo cognitivo.

Il microbiota intestinale non solo facilita l'ottenimento di nutrienti ed energia dal cibo ingerito, ma si occupa anche di convertire molecole di origine dietetica in metaboliti in grado di fungere da segnale per comunicare con l'organismo ospitante.

Tra questi metaboliti possono essere annoverati gli acidi biliari, che vengono sintetizzati nel fegato a partire dal colesterolo e successivamente metabolizzati nel lume intestinale dal microbiota. Gli acidi biliari agiscono come detergenti per facilitare la digestione e l'assorbimento dei lipidi assunti con la dieta, ma possono anche comportarsi come ormoni a livello sistemico legandosi e attivando diversi recettori nucleari e recettori accoppiati a proteine G. Tali recettori regolano a loro volta varie vie di segnale di interesse metabolico nell'organismo ospite. Al tempo stesso, anche gli acidi biliari sono in grado di modulare la composizione del microbiota sia direttamente, grazie al loro potere detergente, sia indirettamente mediante l'attivazione di geni soprattutto a livello dell'intestino tenue.

L'interazione tra microbiota, acidi biliari e recettori per gli acidi biliari espressi a livello sistemico dall'ospite rappresenta pertanto un invitante bersaglio terapeutico, in particolare per le patologie di carattere metabolico. Saranno però necessari studi approfonditi per comprendere i molteplici meccanismi molecolari alla base dell'interazione tra microbiota intestinale e uomo.

Parole chiave: *acidi biliari, microbiota, intestino, colesterolo.*

Bibliografia

- Piemontese A, Bernini F, Zanotti I. Microbiota intestinale: un nuovo protagonista nella eziologia e nel trattamento dell'aterosclerosi? *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi*. 2016; 7: 64-83.
- Gérard P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens*. 2013; 3: 14-24.
- Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464: 59-65.
- Methé BA, Nelson KE, Pop M, et al. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012; 486: 215-21.
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 15718-23.
- Fulde M, Hornef MW. Maturation of the enteric mucosal innate immune system during the post-natal period. *Immunol Rev*. 2014; 260: 21-34.
- Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol*. 2013; 14: 685-90.
- Yu Y, Lu L, Sun J, et al. Preterm infant gut microbiota affects intestinal epithelial development in a humanized microbiome gnotobiotic mouse model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016; 311: G521-32.
- Reinhardt C, Bergental M, Greiner TU, et al. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature*. 2012; 483: 627-31.
- Neuman H, Debelius JW, Knight R, Koren O. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiol Rev*. 2015; 39: 509-21.
- Hyland NP, Cryan JF. Microbe-host interactions: Influence of the gut microbiota on the enteric nervous system. *Dev Biol*. 2016; 417: 182-7.
- Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016; 165: 1332-45.
- Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012; 486: 222-7.
- Haiser HJ, Gootenberg DB, Chatman K, et al. Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta*. *Science*. 2013; 341: 295-8.
- Yano JM, Yu K, Donaldson GP, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*. 2015; 161: 264-76.
- Veiga P, Juste C, Lepercq P, et al. Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 242: 81-6.
- Kellogg TF. Steroid balance and tissue cholesterol accumulation in germfree and conventional rats fed diets containing saturated and polyunsaturated fats. *J Lipid Res*. 1974; 15: 574-9.
- Chiang YR, Ismail W, Heintz D, et al. Study of anoxic and oxic cholesterol metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. *J Bacteriol*. 2008; 190: 905-14.
- Zanotti I, Turrone F, Piemontese A, et al. Evidence for cholesterol-lowering activity by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 through gut microbiota modulation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99: 6813-29.
- Lye HS, Rusul G, Liong MT. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *J Dairy Sci*. 2010; 93: 1383-92.

21. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 2013; 17: 657-69.
22. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, et al. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7: 678-93.
23. Li-Hawkins J, Gåfvells M, Olin M, et al. Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice. *J Clin Invest.* 2002; 110: 1191-200.
24. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* 2013; 17: 225-35.
25. Riottot M, Sacquet E. Increase in the ileal absorption rate of sodium taurocholate in germ-free or conventional rats given an amylo maize-starch diet. *Br J Nutr.* 1985; 53: 307-10.
26. Jones BV, Begley M, Hill C, et al. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 13580-5.
27. Klaassen CD, Cui JY. Mechanisms of How the Intestinal Microbiota Alters the Effects of Drugs and Bile Acids. *Drug Metab Dispos.* 2015; 43: 1505-21.
28. Ridlon JM, Bajaj JS. The human gut sterolbiome: bile acid-microbiome endocrine aspects and therapeutics. *Acta Pharm Sin B.* 2015; 5: 99-105.
29. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res.* 2006; 47: 241-59.
30. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014; 30: 332-8.
31. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature.* 2013; 499: 97-101.
32. Clements WD, Parks R, Erwin P, et al. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut.* 1996; 39: 587-93.
33. Lorenzo-Zúñiga V, Bartoli R, Planas R, et al. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology.* 2003; 37: 551-7.
34. Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM, et al. Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol.* 2013; 58: 949-55.
35. Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev.* 2005; 29: 625-51.
36. Inagaki T, Moschetta A, Lee YK, et al. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 3920-5.
37. Islam KB, Fukiya S, Hagi M, et al. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology.* 2011; 14: 1773-81.
38. Parseus A, Sommer N, Sommer F, et al. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut.* 2017; 66: 429-437.
39. Devkota S, Wang Y, Musch MW, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10*^{-/-} mice. *Nature.* 2012; 487: 104-8.
40. Devkota S, Chang EB. Interactions between Diet, Bile Acid Metabolism, Gut Microbiota, and Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis.* 2015; 33: 351-6.
41. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011; 472: 57-63.
42. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013; 19: 576-85.
43. Macpherson AJ, Heikenwalder M, Ganai-Vonarburg SC. The Liver at the Nexus of Host-Microbial Interactions. *Cell Host Microbe.* 2016; 20: 561-71.
44. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, et al. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell.* 2000; 102: 731-44.
45. Kuipers F, Bloks VW, Groen AK. Beyond intestinal soap-bile acids in metabolic control. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10: 488-98.
46. Watanabe M, Houten SM, Matak C, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature.* 2006; 439: 484-9.
47. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem.* 2003; 278: 9435-40.
48. Matsubara T, Li F, Gonzalez FJ. FXR signaling in the enterohepatic system. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 368: 17-29.
49. Goodwin B, Jones SA, Price RR, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* 2000; 6: 517-26.
50. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2005; 2: 217-25.