



SOCIETÀ ITALIANA DI BIOLOGIA SPERIMENTALE

PRESIDENTE: PROF. MASSIMO COCCHI

La Sclerosi Multipla e il Filo di Arianna

Sclerosi Multipla, Disordini dell'Umore, Infiammazione, Microbiota Intestinale e Cellule Staminali

Massimo Cocchi

Multiple sclerosis

Coopera con il sistema immunitario

Barriera contro patogeni

Assorbimento nutrienti

MICROBIOTA

Conservazione della funzione intestinale

Inflammation

Mesoderm (Red blood cells)

Ectoderm (Skin cells)

Endoderm (Neurons, Liver cells)

Diabetes, **Inflingivitis**, **Cardiovascular disease**, **Arthritis**, **Alzheimer's Disease**, **Asthma**, **Ulcerative & Inflammatory**

Metabolic Syndrome, **Infectious**, **Injury**

FANO 13

no sta diventando una città di depressi: ottocento visite all'anno e molte donne Dall'Alame a un convegno nazionale con premio Nobel ma senza Asur

MUSICA Concerto a teatro col grande violino di Massimo Quarta

MODIFICAZIONI BIOMOLECOLARI NEI DISORDINI DI NEUROPLASTICITÀ

“...the chief curse of the illness...I must ask constant services of people I love most closely...it is an illness accompanied by frustration...an illness that inflicts awareness of loss...sporadically it is, in its manifestations, a disgusting disease”
Brigid Brophy

Definizione di Sclerosi Multipla

Aseen Malhotra says in his “observations” in the British Medical Journal: **“Correlation” does not mean “Cause”**.

Bene, tenendo presente il concetto suddetto, andiamo ad analizzare cos'è la Sclerosi Multipla e quali sono i principali reperti causativi della malattia, così come evidenziati nella letteratura scientifica internazionale.

Secondo Compton & Coles (Alastair Compston, Alasdair Coles. *Multiple sclerosis. Lancet 2008; 372: 1502–17*) la sclerosi multipla è principalmente un **disturbo infiammatorio** del cervello e del midollo spinale in cui l'infiltrazione focale linfocitaria porta danni alla mielina e agli assoni. Inizialmente, l'infiammazione è transitoria, la rimielinizzazione si ripristina ma non è durevole.

Lo stadio precoce della malattia è caratterizzato da episodi di disfunzione neurologica recuperabili, tuttavia, nel tempo questi episodi divengono manifestazioni patologiche dominanti e dominate da attivazione diffusa della microglia e neuro degenerazione diffusa e cronica portando, come manifestazione clinica, alla disabilità.

Ciascun specialista e il paziente vedono la malattia sotto il loro punto di vista con differenti definizioni e caratterizzazioni. Per il patologo, la sclerosi multipla è un disturbo del sistema nervoso centrale, che si manifesta con demielinizzazione su base infiammatoria focale acuta con ridotta capacità di riparazione e formazione delle placche sclerotiche croniche disseminate. Per il neurologo, la sclerosi multipla è un disturbo giovanile per la cui diagnosi occorre la presenza di almeno due lesioni demielinizzanti all'interno del cervello o del midollo spinale, con insorgenza a distanza di tempo. Per il clinico, la sclerosi multipla è il prototipo di una malattia infiammatoria autoimmune del sistema nervoso centrale. Il paziente vede la malattia come la sommatoria di una moltitudine sintomatologica, con manifestazioni ricorrenti e un corso imprevedibile. Per tutti questi gruppi, la sclerosi multipla rimane una malattia difficile per le quali le soluzioni sembrano raggiungibili, ma rimangono ancora sfuggenti (Alastair Compston, Alasdair Coles. *Multiple sclerosis. Lancet 2002; 359: 1221–31*).

Sclerosi Multipla: fattori di rischio

L'etiologia della SM non è però completamente genetica, in quanto esistono forti determinanti ambientali alla suscettibilità di un individuo.

La sclerosi multipla, quindi, sembra essere causata da una interazione tra i geni e l'ambiente. Fra i principali fattori di rischio per la SM, oltre alla latitudine, dobbiamo ricordare altri importanti fattori di rischio ambientale, quali:

- ipotesi igienica e infezione da Epstein-Barr (EBV)
- Fumo
- Obesità infantile
- Basso livello di vitamina D

Agire su questi fattori, in particolare il fumo e la vitamina D, può ridurre l'incidenza di SM migliorando la prognosi negli individui con SM. Vi sono prove che giustificano interventi in termini di cessazione del fumo e/o di correzione della carenza di vitamina D. Sono, tuttavia, necessari studi rigorosi per ottenere una prova definitiva del rapporto fra deficit di vitamina D e rischio di SM, nonché per la corretta valutazione dei dosaggi ottimali di 25 (OH) D per eseguire il trattamento (Alberto Ascherio. *Environmental factors in multiple sclerosis. Expert Rev. Neurother. 13(12s), 3–9 2013*).

Interludio

Il concetto di infiammazione

L'infiammazione è una reazione di difesa dell'organismo contro l'induzione di lesioni. Tradizionalmente l'infiammazione è caratterizzata da arrossamento, gonfiore, dolore, calore e alterazioni di funzioni dell'organismo. Il rossore e il calore sono causati da un aumento del flusso sanguigno, il gonfiore dall'accumulo di liquidi e il dolore dal gonfiore, ma anche da rilascio di composti che danno origine a segnali nervosi. Il deterioramento delle funzioni riconosce ragioni diverse. L'infiammazione è un fenomeno che serve per eliminare gli agenti nocivi e preparare il terreno per la guarigione.

L'infiammazione può essere attivata da fattori interni ed esterni. Potenti induttori dell'infiammazione sono la presenza di microrganismi nei siti di non appartenenza. Le cellule e le molecole coinvolte nel sistema di difesa infiammatoria reagiscono immediatamente contro gli elementi estranei a quelli degli organismi animali, quali quelli dei batteri e dei funghi (es.: parete cellulare) e dei virus (es.: RNA e DNA); inoltre, lesioni al tessuto e alle cellule dell'organismo provocano infiammazione. Quando le cellule del corpo sono danneggiate, sostanze, normalmente nascoste all'interno delle cellule, vengono rilasciate e funzionano come segnali di pericolo endogeno. Tutte le tipologie delle reazioni immunitarie porteranno all'attivazione del sistema di difesa anti-infiammatoria.

Il processo infiammatorio parte da cellule già presenti nel tessuto, ad esempio macrofagi residenti, cellule dendritiche e Mast Cells (MCS). I segnali di pericolo attivano queste cellule e vengono rilasciati i mediatori infiammatori, che iniziano il processo responsabile dei segni clinici dell'infiammazione. Il processo di infiammazione coinvolge quattro fasi:

- 1. I vasi sanguigni si allargano, con conseguente aumento del flusso sanguigno (causando arrossamento e aumento di calore);*
- 2. Aumentata la permeabilità dei vasi sanguigni, che si traduce in un deflusso di fluidi e proteine plasmatiche nel tessuto, manifestandosi come gonfiore;*
- 3. I globuli bianchi vengono reclutati dalla circolazione del sangue al tessuto;*
- 4. Il metabolismo viene regolato, ad esempio, con un aumento dei livelli di glucosio nel sangue e si possono verificare sintomi quali febbre, stanchezza e perdita di appetito.*

Nell'infiammazione acuta ci verifica un accumulo di granulociti neutrofili nel tessuto infiammato, mentre nell'infiammazione cronica c'è un accumulo di linfociti, macrofagi e cellule plasmatiche nel tessuto e anche fenomeni di infiltrazione tissutale. In una reazione allergica, tuttavia, ci sarà una rapida accumulazione di granulociti eosinofili e linfociti T, e talvolta anche neutrofili. Un esempio rappresentativo di una situazione che porta alla infiammazione acuta è un'infezione batterica, ma anche la morte cellulare, l'infarto del miocardio o la decomposizione di tumori portano all'infiammazione acuta. Le cause tipiche dell'infiammazione cronica sono infezioni con batteri intracellulari, malattie autoimmuni, allergie di contatto e reazioni contro corpi estranei (Mölne, J.; Wold, A. *Inflammation*, 1st ed. Liber AB: Stockholm, Sweden, 2007).

L'infiammazione sistemica a basso grado (Infiammazione Silente), caratterizzata principalmente da un aumento della CRP (Proteina C Reattiva), è associata ad un aumento del rischio di malattie cardiovascolari (Ridker, P.M. *Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. Circulation* 2003, 107, 363-369) e di obesità; gli individui obesi, infatti, hanno livelli più elevati di CRP rispetto a soggetti di peso normale (Piéroni, L.; Bastard, J.P.; Piton, A.; Khalil, L.; Hainque, B.; Jardel, C. *Interpretation of circulating C-reactive protein levels in adults: Body mass index and gender are a must. Diabetes Metab.* 2003, 29, 133-138; Visser, M.; Bouter, L.M.; McQuillan, G.M.; Wener, M.H.; Harris, T.B. *Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. JAMA* 1999, 282, 2131-2135).

Infiammazione silente e citochine

Nell'accezione comune, come precedentemente riportato, con il termine infiammazione si intende qualche cosa di percepibile, cioè, il divenire di un processo che, normalmente, si estrinseca, oltre ai classici segni esterni con manifestazione dolorosa.

Non è sempre così, le acquisizioni relative alla scoperta di nuovi mediatori del processo infiammatorio, cioè le citochine, hanno consentito, con la possibilità di dosarle, di individuare una presenza infiammatoria silente in molte gravi patologie.

Il termine "citochine" deriva da una combinazione di due parole greche - "cito" che significa cellulare e "kinos" che significa movimento. Le citochine sono molecole di segnalazione cellulare che aiutano la comunicazione cellula-cellula nelle risposte immunitarie e stimolano il movimento delle cellule verso siti di infiammazione, infezioni e traumi.

Le citochine si classificano in:

1. **Citochine anti-infiammatorie:** contrastano vari aspetti dell'infiammazione, per esempio, l'attivazione delle cellule o la produzione di citochine pro-infiammatorie, contribuendo così al controllo della entità delle risposte infiammatorie in vivo [Li X et al. IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine: a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One*. 2012;7(3)]. Quando i tessuti si infiammano, i fattori pro-infiammatori possono stimolare i tessuti per esprimere citochine anti-infiammatorie "reattive", e contrastare la risposta infiammatoria.
2. **Citochine pro-infiammatorie:** un termine generale per quelle citochine immunomodulanti che favoriscono l'infiammazione.

Il termine **meta-infiammazione** [Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867 (2006)] è stato utilizzato per descrivere uno *stato fisiopatologico causalmente legato allo sviluppo di infiammazione del tessuto adiposo e alla sindrome metabolica*. Questa infiammazione, metabolicamente innescata, si osserva, per esempio, nell'obesità indotta dalla dieta e si caratterizza per l'attivazione di macrofagi pro-infiammatori a scapito di macrofagi anti-infiammatori che, invece, possono proteggere gli adipociti dall'infiammazione in soggetti magri [Lumeng CN et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation* 117(1): 175-184 (2007); Patsouris D et al. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metabolism* 8(4): 301-309 (2008)].

Il termine ***infiammazione sterile***, invece, è usato per caratterizzare l'infiammazione che si verifica in assenza di qualsiasi microrganismo [Chen GY and Núñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews. Immunology* 10(12): 826-837 (2010)].

Altri rilevanti siti, oltre alla cellula adiposa (obesità), dove le citochine infiammatorie giocano un ruolo primario sono:

Intestino: il sistema gastroenterico rappresenta un bersaglio di azione delle citochine pro-infiammatorie come risulta evidente nella *patogenesi dell'infiammazione intestinale* [Pizarro TT, Cominelli F. Cytokine therapy for Crohn's disease: advances in translational research. *Annu Rev Med*. 2007; 58:433-444; Olson TS, et al. The primary defect in experimental ileitis originates from a non-hematopoietic source. *J Exp Med*. 2006; 203(3):541-552; Pagnini C, et al. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(1):454-45].

Tessuto Adiposo: Il sistema immunitario innato e i suoi principali mediatori, le citochine, sono sempre più ritenute di cruciale importanza nell'infiammazione metabolica che è stato osservata nell'obesità morbida e nel diabete di tipo 2. L'obesità morbida o patologica è normalmente associata all'infiammazione del tessuto adiposo, ed è caratterizzata da un'aumentata espressione di diverse citochine pro infiammatorie come il TNF-alpha, l'interleuchina-1 e 6 che includono i monociti, i macrofagi, i neutrofili, i linfociti B, T e altri [Gerner R.R. Wieser V. Moschen A.R. Tilg H. Metabolic inflammation: role of cytokines in the crosstalk between adipose tissue and liver. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2013, 91(11): 867-872].

Malattie Cardiovascolari: Complesse interazioni cellulari e infiammatorie sono coinvolte nel progresso delle malattie cardiovascolari, quali ad esempio, *L'associazione fra citochine pro-infiammatorie con disfunzioni endoteliali e aterosclerosi* sembra essere evidente (Kofler S, Nickel T, and Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clinical Science* (2005) 108: 205–213).

Cervello e Comportamento: Nuove ricerche hanno portato a importanti progressi nella comprensione di come eventi immuno-correlati nella periferia possono influenzare processi del sistema nervoso centrale, alterando in tal modo la cognizione, l'umore, e il comportamento, e questi progressi stanno suggerendo che infiammazione può avere importanti implicazioni a lungo termine per il cervello (Steven F. Maier, and Linda R. Watkins. *Consequences of the Inflamed Brain. Progress* 2012).

Va ricordata anche l'importanza di una corretta protezione dell'epitelio intestinale da parte del Microbiota. *La via potenziale di accesso al cervello da parte del Microbiota e dei suoi metaboliti si apre attraverso un sistema integrato e complesso di segnali neurali, ormonali e immunologici.*

Sclerosi Multipla, patogenesi e evoluzione della placca: ripariamo di infiammazione

Patogenesi

Esiste una ragionevole certezza che il processo che porta alla malattia cominci con un'aumentata migrazione di linfociti auto reattivi attraverso la **barriera emato-encefalica** (*Se particolari cellule note come APC, antigen presenting cells, si combinano con un'auto-antigene, lo possono esporre ai cloni T auto reattivi. In tal modo i linfociti T, grazie anche all'intervento di citochine, possono proliferare e volgere l'espansione clonale in senso Th1. Sembra che una forte espansione dei linfociti Th1 sia all'origine del salto di qualità che consente a una 'normale' reazione autoimmunitaria di trasformarsi in evento patologico isto lesivo. Ne consegue un insieme di fenomeni che comporta un'azione citotossica da parte di linfociti T CD81 che esplicano auto reattività citotossica sulle cellule dell'organo bersaglio.*)

Il passaggio dalla sorveglianza fisiologica a una cascata patologica può derivare da difetti regolatori che consentono a queste cellule di creare una risposta immunitaria all'interno del cervello.

I linfociti regolatori in persone con sclerosi multipla non sono in grado di sopprimere le cellule effettrici (cellule in grado di partecipare attivamente alla risposta immunitaria e di combattere e distruggere il patogeno) (Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafl er DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199: 971-79).

Queste cellule auto reattive, alla stimolazione, non esercitano un'efficace apoptosi.

Presumibilmente, il fallimento dei meccanismi regolatori locali all'interno del cervello predispone a particolari siti infiammatori, con predominanza di infiltrati cellulari di cellule CD8 + peri vascolari, causando le cosiddette placche attorno ai ventricoli laterali e sul corpus callosum, nella corteccia e nella materia bianca subcorticale, nei nervi ottici e nel sistema cerebrale e per tutto il midollo spinale (Shi Y, Feng Y, Kang J, et al. Critical regulation of CD4+ T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1. *Nat Immunol* 2007; 8: 817-24; Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 233-40; Kebir H, Kreyemborg K, Ifergan I, et al. Human T(H)17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007; 13: 1173-75; Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 146-55).

I mediatori infiammatori tossici vengono rilasciati, sostenendo la rottura della barriera emato-encefalica e danneggiando assoni e glia.

Citochine e fattori di crescita rilasciati da astrociti reattivi e microglia come parte del processo infiammatorio acuto promuovono la rimielinizzazione endogena. Ma, nel tempo, la

reattività degli astrociti sigilla la lesione e la gliosi provoca una barriera fisica per l'ulteriore rimielinizzazione, riducendo la capacità di compensare i deficit cumulativi e promovendo lo stato di transizione allo stadio del deficit persistente.

Sembra chiara la componente infiammatoria nella SM come è autorevole l'ipotesi che la progressione della sclerosi multipla sia riconducibile alla perdita cumulativa di assoni, iniziata e mantenuta da complesse risposte infiammatorie che agiscono in individui che sono intrinsecamente suscettibili di neuro degenerazione e che cambiano all'aumentare del danno tissutale (Alastair Compston, Alasdair Coles. *Multiple sclerosis. Lancet* 2008; 372: 1502–17).

La sclerosi multipla, quindi, è un disordine autoimmune prototipico del sistema nervoso centrale e, con un rischio di vita di uno su 400, è potenzialmente la causa più comune di disabilità neurologica nei giovani adulti. Come per tutti i fenomeni complessi, il disordine si traduce in una combinazione tra fattori ambientali ancora non identificati e geni di suscettibilità. Insieme, questi fattori innescano una cascata di eventi, coinvolgendo il sistema immunitario, lesioni infiammatorie acute degli assoni e della glia, recupero di funzione e riparazioni strutturali, gliosi post-infiammatorie e neurodegenerazione. Il coinvolgimento sequenziale di questi processi si basa sul percorso clinico caratterizzato da episodi con recupero, episodi che lasciano deficit persistenti e progressione secondaria.

Sclerosi Multipla e Microbiota Intestinale

Alla luce di quanto sopra esposto sembrano esserci molte condizioni per fare ipotizzare un coinvolgimento del Microbiota Intestinale nella gestione dei fenomeni infiammatori che, a livello del sistema nervoso, possono portare o accompagnarsi a modificazioni strutturali e funzionali. Esamineremo, pertanto, il rapporto Microbiota e Infiammazione, nonché il rapporto Mast Cells e infiammazione prima di addentrarci nella descrizione delle relazioni emergenti fra Microbiota e Sclerosi Multipla.

Non dimenticando mai quanto riferito da William P. Hanage e che vale per ogni novità scientifica che cadenza un'era (William P. Hanage *Microbiome science needs a healthy dose of scepticism. 21 AUGUST 2014 | VO L 5 1 2 | N A T U R E*): *La storia della scienza è piena di esempi di nuovi campi emozionanti che hanno promesso un flusso d'oro per i farmaci e approfondimenti sulla salute, ma ha richiesto scetticismo e anni di fatiche anche per una parziale offerta di risultato.*

Microbiota e infiammazione intestinale

L'intestino rappresenta la prima sede d'incontro di numerosi antigeni e possiede una complessa articolazione di organi linfoidei che, tutti assieme, vengono denominati GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue).

Esso consiste di linfonodi mesenterici, di placche del Peyer, di follicoli linfoidei isolati e di una vasta disseminazione di linfociti e cellule dendritiche nella lamina propria e nell'epitelio intestinale (Rescigno M. Urbano M. Valzasina B. Francolini M. Rotta G. Bonasio R. Granucci F. Kraehenbuhl J.P. Ricciardi-Castagnoli P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol*, 2: 361–367; Newberry R.D. Lorenz R.G. (2005). Organizing a mucosal defence. *Immunol. Rev*, 206: 6–21; Forchielli, M.L. Walker W.A. (2005). The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br. J. Nutr*, 93: S41– S48). I linfonodi mesenterici sono un altro punto chiave della localizzazione anatomica delle risposte infiammatorie (Izcue A. Coombes J.L. Powrie F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu. Rev. Immunol*, 27: 313–338).

Il GALT svolge importanti funzioni immunitarie; basti pensare all'enorme quantità di antigeni che entrano costantemente in contatto con la mucosa che riveste la superficie interna dell'intestino. La risposta immunitaria intestinale sembra essere regolata anche da sostanze che vengono ingerite con la dieta (Tilg H. (2012). Diet and Intestinal Immunity. *N Engl J Med*, 366: 181-

1835), in grado di modificare la composizione del microbiota intestinale. Recentemente, infatti, si è visto che alcuni alimenti della dieta, derivati dai vegetali, interagiscono con i recettori del sistema immunitario intestinale e regolano l'organogenesi dei follicoli linfatici. La funzione immunitaria dell'intestino è regolata dal recettore AhR (aril-idrocarbonio) che viene attivato anche da specifici componenti vegetali e che lavora a favore del mantenimento di un equilibrio immunitario agendo tra le altre cose sui linfociti intraepiteliali, prima barriera della mucosa intestinale (Kiss EA, Vonarbourg C, Kopfmann S, et al. (2011). Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science*, 334: 1561-1565; Li Y, Innocentin S, Withers D.R. (2011). Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell*, 147: 629-640; Hou J.K, Abraham B, El-Serag H. (2011); Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol*, 106: 563-573; Monteleone I. et al. (2011). Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 141: 237-248).

L'intestino possiede quindi un sistema immunitario finalizzato alla protezione verso gli agenti patogeni e, nello stesso tempo, organizzato per evitare attività immunitarie, quando esse non siano necessarie.

Il processo infiammatorio inizia da cellule presenti nel tessuto, ad esempio macrofagi, cellule dendritiche e Mast cellule, attivate da segnali di danno, che rilasciano mediatori dell'infiammazione. I macrofagi nel processo infiammatorio svolgono tre principali funzioni:

1. Presentazione dell'antigene

2. Fagocitosi

3. Immuno modulazione (produzione di citochine e di fattori di crescita)

Gli stessi macrofagi sono, a un tempo, promotori e risolutori del processo infiammatorio e svolgono un ruolo critico nell'iniziazione, nel mantenimento e nella risoluzione dello stesso processo infiammatorio (Palmblad. J. (1984). The role of granulocytes in inflammation. *Scand. J. Rheumatol*, 13: 163-172; Fujiwara N, Kobayashi K. (2005). Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 4: 281-286; Anderson C.F, Mosser D.M. (2002). A novel phenotype for an activated macrophage: The type 2 activated macrophage. *J.Leukoc. Biol*, 72: 101-106).

Vi è un equilibrio pro/anti infiammatorio fra i Macrofagi 1 e 2. I primi (pro-infiammatori) sono attivati da alcuni mediatori quali i Lipopolisaccaridi (LPS), IL-1 β e IFN- γ , e producono citochine pro-infiammatorie (TFN- α , Il-6, IFN- γ , IL-6 e IL-2) favorendo la produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), (Anderson C.F, Mosser D.M. (2002). A novel phenotype for an activated macrophage: The type 2 activated macrophage. *J. Leukoc. Biol*, 72: 101-106; 13. Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev*, 3: 23-35).

I Macrofagi 2 producono citochine meno pro-infiammatorie e molte sostanze anti infiammatorie quali IL- 10, TGF- β e IL-1, che agiscono come antagonisti recettoriali (Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev*, 3: 23-35), essi, pertanto, possono essere ritenuti fortemente coinvolti nel blocco delle risposte infiammatorie nella fase di riparazione tissutale e della immunità di tipo II (Mosser D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol*, 73: 209-212.).

Fra sistema immunitario intestinale e microbiota ci sono complesse relazioni ed è importante, per le cellule epiteliali e il sistema immunitario, riconoscere gli agenti patogeni e non patogeni.

Dai batteri possono partire segnali che si trasmettono ai macrofagi, alle cellule dendritiche e ai linfociti, attraverso molecole espresse alla superficie delle cellule epiteliali come le molecole del complesso I e II e i Toll Like Receptors (TLRs), (from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am. J. Pathol*, 160: 165-173; Hershberg R.M, Mayer L.F. (2000). Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells-polarity and complexity. *Immunol. Today*, 21: 123-128).

Di questi ultimi, ne esistono almeno dieci a livello umano, negli adulti sono espressi in molti tessuti e le interazioni fra TLRs e alcuni antigeni batterici danno inizio a una cascata di segnali intracellulari che determinano una sovra regolazione dei geni infiammatori, la produzione di citochine pro-infiammatorie e d'interferone. Essi, inoltre, reclutano cellule

mieloidi e stimolano l'espressione di molecole co-stimolanti, necessarie per indurre una risposta immunitaria adattativa degli antigeni cellulari (Testro A.G. Visvanathan K. (2009). Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J. Gastroenterol. Hepatol*, 24: 943–954).

Il microbiota può alterare i livelli di espressione dei TLRs e ci sono possibilità diverse d'interazione che coinvolgono le cellule M (Newberry R.D. Lorenz R.G. (2005). Organizing a mucosal defence. *Immunol. Rev*, 206: 6–21) e le cellule dendritiche che presentano antigeni alle T cellule e migrano nelle zone delle T cellule o ai linfonodi mesenterici o interagiscono con le cellule B della memoria (Pickard K.M. Bremner A.R. Gordon, J.N. MacDonald T.T. (2004). Microbial gut interactions in health and disease. *Immune responses. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*, 18: 271-285).

I batteri patogeni e non patogeni possono entrare nel tessuto mucoso attraversando la mucosa dove si trovano le cellule dendritiche, che estendono i loro dendriti attraverso le tight junctions delle cellule epiteliali (Rescigno M. Urbano M. Valzasina B. Francolini M. Rotta G. Bonasio R. Granucci F. Kraehenbuhl J.P. Ricciardi-Castagnoli P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol*, 2: 361–367), e i linfociti intraepiteliali, a cui vengono presentati gli antigeni batterici.

Normalmente i batteri sono tenuti distanti dall'epitelio intestinale per opera del muco prodotto dalle cellule caliciformi (goblet cells). Queste, infatti, secernono lo strato protettivo di muco che limita il contatto fra i batteri e l'epitelio intestinale, incluse le cellule di Paneth che si trovano nelle cripte dell'intestino tenue e producono peptidi battericidi (Cash H.L. Whitham C.V. Behrendt C.L. Hooper L.V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 313: 1126–1130).

Anche le IgA, presenti nel secreto intestinale, sono coinvolte nell'immunità specifica catturando gli antigeni, quindi, inibendo la loro penetrazione nella mucosa (Cerutti A. Rescigno M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*, 28: 7).

La microflora batterica svolge, quindi, un lavoro importante sull'infiammazione e influenza favorevolmente la composizione del microbiota. Questi eventi possono essere ritenuti una buona strategia per controllare e modulare il processo infiammatorio.

MCs: dal sangue al cervello

Sono molti anni che è stata dimostrata la presenza di MCs nel cervello di molte specie animali compreso l'uomo (Dropp JJ (1972) Mast cells in the central nervous system of several rodents. *Anat Rec* 174:227–238; Dropp JJ (1976) Mast cells in mammalian brain. *Acta Anat* 94:1–21; Theoharides TC (1990) Mast cells: the immune gate to the brain. *Life Sci* 46:607–617), per non dire di Neumann che nel 1890 (Neumann J (1890) Ueber das Vorkommen der sogenannten "Mastzellen" bei pathologischen Veränderungen des Gehirns. *Virchows Arch Pathol Anat* 122:378–380) le aveva identificate in cervelli infartuati e sul bordo delle placche della sclerosi multipla.

Le Mcs sono anche state implicate nelle patologie demielinizzanti autoimmuni, riprodotte in modelli sperimentali animali (Powell HC, Braheny SL, Myers RR, Rodriguez M, Lampert PW (1983) Early changes in experimental allergic neuritis. *Lab Invest* 48:332–338; Seeldrayers PA, Yasui D, Weinter H L, Johnson D (1989) Treatment of experimental allergic neuritis with nedocromil sodium. *J Neuroimmunol* 25:221–226; Brosnan CF, Claudio L, Tansey FA, Martiney J (1990) Mechanisms of autoimmune neuropathies. *Ann Neurol* 27:S75–79) per un effetto legato alle proteasi neutre in grado di degradare la mielina.

Le MCs possono de-granulare in risposta a una proteina basica della mielina inducendo demielinizzazione centrale (Theoharides TC, Baloyannis SJ, Yanolidis LS (1991) Activated rat peritoneal mast cells can cause syngeneic brain demyelination in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol* 4:137–144) e periferica (Johnson D, Seeldrayers PA, Weiner HL (1988) The role of mast cells in demyelination. 1. Myelin proteins are degraded by mast cell proteases and myelin basic protein and P2 can stimulate mast cell degranulation. *Brain Res* 444:195–198).

Nel cervello di mammiferi normali le MCs sono localizzate nelle leptomeningi ((Dropp JJ (1972) Mast cells in the central nervous system of several rodents. *Anat Rec* 174:227–238; Dropp JJ (1976) Mast cells in mammalian brain. *Acta Anat* 94:1–21; Theoharides TC (1990) Mast cells: the immune gate to the brain. *Life Sci* 46:607–617), si concentrano nel parenchima cerebrale lungo i vasi sanguigni dei nuclei del talamo dorsale (Goldschmidt RC, Hough LB, Glick SD (1985) Rat brain mast cells: contribution to brain histamine levels. *J Neurochem* 44:1943–1947).

Nel talamo le MCs si trovano sul lato cerebrale della barriera emato encefalica (Dimitriadou V, Lambracht-Hall M, Reichler J, Theoharides TC (1990) Histochemical and ultrastructural characteristics of rat brain perivascular mast cells stimulated with compound 48/80 and carbachol. *Neuroscience* 39:209–224; Manning KA, Pienkowski TP, Uhlrich DJ (1994) Histaminergic and non-

histamine-immunoreactive mast cells within the cat lateral geniculate complex examined with light and electron microscopy. *Neuroscience* 63:191–206).

Le MCs sono in grado di comunicare con i neuroni, gli astrociti, la microglia, la matrice extracellulare e i vasi sanguigni.

In assenza di condizioni stressogene, di malattie, di trauma, il numero delle MCs è di gran lunga inferiore a quello dei neuroni, della microglia e di altre cellule residenti nel cervello.

C'è evidenza che le MCs possano penetrare la barriera emato encefalica e romperne l'integrità.

Le stesse MCs mature possono migrare dal sangue al cervello (Silverman AJ, Sutherland AK, Wilhelm M, Silver R: Mast cells migrate from blood to brain. *J Neurosci*, 2000; 20: 401–8).

I meccanismi che inducono la rottura della barriera emato encefalica e la degradazione della lamina basale, possono coinvolgere componenti delle MCs quali l'eparina, l'istamina, la serotonina, l'ossido nitrico, il VIP, il CGRP (calcitonin gene-related peptide), il fattore di accrescimento endoteliale, le citochine e il TNF- α che, a sua volta, induce l'espressione della molecola di adesione cellulare e permette ai leucociti l'ingresso nei tessuti colpiti (Brown MA, Hatfield JK: Mast Cells are Important Modifiers of Autoimmune Disease: With so Much Evidence, Why is There Still Controversy? *Front Immunol*, 2012; 3: 147; Lindsberg PJ, Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML: Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010; 30: 689–702; Nelissen S, Lemmens E, Geurts N et al: The role of mast cells in neuroinflammation. *Acta Neuropathol*, 2013; 125: 637–50).

La produzione di TNF- α da parte delle MCs sembra precedere il suo ritrovamento nelle altre cellule (Jin Y, Silverman AJ, Vannucci SJ: Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Stroke*, 2009; 40: 3107–12).

La triptasi delle MCs attiva i recettori 2 della microglia (PAR 2) facilitando il rilascio di mediatori pro-infiammatori come il TNF- α la IL-6 e le specie reattive dell'ossigeno che, conseguentemente, sovraregolano l'espressione PAR2 dei recettori sulle MCs (Zhang S, Zeng X, Yang H et al: Mast cell tryptase induces microglia activation via protease-activated receptor 2 signaling. *Cell Physiol Biochem*, 2012; 29: 931–40; Zhang H, Yang H, He S: TNF increases expression of IL-4 and PARs in mast cells. *Cell Physiol Biochem*, 2010; 26: 327–36).

Oltre alla microglia le MCs sono in relazione dinamica con gli astrociti. Le MCs e gli astrociti sono co-localizzati nelle aree perivascolari e nel talamo. In vitro, astrociti e MCs si attivano reciprocamente rilasciando istamina, leucotrieni e citochine. Le citochine rilasciate dagli astrociti possono indurre de-granulazione delle MCs (Kim DY, Jeung D, Ro JY: Signaling pathways in the activation of mast cells cocultured with astrocytes and colocalization of both cells in experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*, 2010; 185: 273–83; Kim DY, Hong GU, Ro JY: Signal pathways in astrocytes activated by cross-talk between of astrocytes and mast cells through CD40-CD40L. *J Neuroinflammation*, 2011; 8: 25; Hosli L, Hosli E, Schneider U, Wiget W: Evidence for the existence of histamine H1- and H2-receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neurosci Lett*, 1984; 48: 287–9; Dong Y, Benveniste EN: Immune function of astrocytes. *Glia*, 2001; 36: 180–90).

Sembra che il ruolo delle MCs nell'induzione e nel coinvolgimento del processo infiammatorio a livello cerebrale non sia del tutto certo o chiaro.

E' opinione di chi scrive, comunque, che l'evenienza di un coinvolgimento infiammatorio delle MCs a livello cerebrale, sia elemento da tenere in considerazione. In modo particolare l'incremento di Acido Arachidonico nel cervello in corso di depressione potrebbe essere giustificato dalle MCs, così come il loro effetto pro-infiammatorio, condizione che si accompagna al fenomeno depressivo (Cocchi M, Tonello L, "Bio molecular considerations in Major Depression and Ischemic Cardiovascular Disease". *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 9: 2-11. 2010; Benedetti, S., Bucciarelli, S., Canestrari, F., Catalani, S., Mandolini, S., Marconi, V., Mastrogiacomo, A., Silvestri, R., Tagliamonte, M., Venanzini, R., Caramia, G., Gabrielli, F., Tonello, L. and Cocchi, M. (2014) Platelet's Fatty Acids and Differential Diagnosis of Major Depression and Bipolar Disorder through the Use of an Unsupervised Competitive-Learning Network Algorithm (SOM). *Open Journal of Depression*, 3, 52-73; Cocchi M., Tonello L., "Biological, Biochemical and Mathematical considerations about the use of an Artificial Neural Network (ANN) for the study of the connection between Platelet Fatty Acids and Major Depression", *J. Biol. Res. LXXXI*, 82-87, 2006).

Conversazione e comunicazione fra MCs e nervi

In condizioni sia fisiologiche sia patologiche è stata dimostrata l'esistenza di una comunicazione funzionale fra MCs e nervi (Marshall JS, Waserman S. Mast cells and the nerves—potential interactions in the context of chronic disease. *Clin Exp Allergy* 1995;25: 102–10; van der Kleij HPM, Blennerhassett M, Bienenstock J. Nerve-mast cell interactions—partnership in health and disease. In: Bienenstock J, Blennerhassett M, Goetzl E, editors. *Autonomic neuroimmunology*. *Autonomic Neuroscience Series*. Vol. 15. London, (UK): Taylor&Francis group; 2003 p. 139–170).

Meccanismi neuronali sono coinvolti nell'attivazione delle MCs e le MCs operano come trasduttori dell'informazione fra nervi periferici ed eventi infiammatori locali.

Fra MCs e nervi, in molti tessuti, esiste un'associazione anatomica (Purcell WM, Atterwill CK. Mast cells in neuroimmune function: neurotoxicological and neuropharmacological perspectives. *Neurochem Res* 1995; 20:521–32; Arizono N, Matsuda S, Hattori T, et al. Anatomical variation in mast cell nerve associations in the rat small intestine, heart, lung, and skin: similarities of distances between neural processes and mast cells, eosinophils, or plasma cells in the jejunal lamina propria. *Lab Invest* 1990; 62:626–34; Bienenstock J, MacQueen G, Sestini P, et al. Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo. *Am Rev Respir Dis* 1991;143: S55–8; Pang X, Boucher W, Triadafilopoulos G, et al. Mast cell and substance P-positive nerve involvement in a patient with both irritable bowel syndrome and interstitial cystitis. *Urology* 1996; 47:436–8).

In diversi tessuti le MCs tissutali hanno dimostrato attivazione anche in condizioni di normalità suggerendo l'esistenza di un'informazione costante al sistema nervoso (Bauer O, Razin E. Mast cell-nerve interactions. *New Physiol Sci* 2000; 15:213–8).

Anche in vivo si riscontra una via di comunicazione funzionale e bidirezionale.

Nello stress psicologico dell'animale da esperimento si registra un aumento di secrezione di ioni cloro da parte dell'epitelio intestinale, un aumento della secrezione colica di mucina e un aumento della permeabilità intestinale. Questi fenomeni sono in parte mediati dalle MCs e in parte dalla sostanza P (Pothoulakis C, Castagliuolo I, Leeman SE. Neuroimmune mechanisms of intestinal responses to stress. Role of corticotropin releasing factor and neurotensin. *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:635–48; Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, et al. Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol* 1999;277: G391–9; Santos J, Benjamin M, Yang PC, et al. Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278: G 847–54).

L'attività delle MCs in condizioni di salute e malattia configura elementi di grande complessità.

Attività secretorie possono avvenire anche senza fenomeni di de-granulazione e le molecole immagazzinate negli stessi granuli possono essere rilasciate con modalità discriminanti (Theoharides TC, Kops SK, Bondy PK, Askenase PW. Differential release of serotonin without comparable histamine under diverse conditions in the rat mast cell. *Biochem Pharmacol* 1985; 34:1389–98).

Le MCs possono essere coinvolte in modo sostanziale in processi infiammatori nei quali i fenomeni di de-granulazione non sono comunemente osservati.

Una serie di ricerche ha dimostrato quadri ultrastrutturali di attivazione dei granuli contenuti nelle MCs o di frammentaria de-granulazione, associati a secrezioni differenziali (Ratiff TL, Klutke CG, Hofmeister M, et al. Role of the immune response in interstitial cystitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;74:209–16).

Anche a livello intestinale sono state ritrovate elevate concentrazioni di istamina, dopo stimolazione elettrica vagale, senza fenomeni di de-granulazione delle MCs (Gottwald TP, Hewlett BR, Lhotak S, Stead RH. Electrical stimulation of the vagus nerve modulates the histamine content of mast cells in the rat jejunal mucosa. *Neuroreport* 1995;7:313–7).

Queste dimostrazioni vanno a supporto di una potenziale regolazione delle MCs da parte del sistema nervoso centrale e di una modulazione dell'attività delle MCs senza de-granulazione.

Ancora la IL-1 stimola la secrezione della IL-6 senza rilascio della triptasi, proteasi associata ai granuli (Kandere-Grzybowska K, Letourneau R, Kempuraj D, et al. IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. *J Immunol* 2003; 171: 4830–6).

La secrezione selettiva di IL-6 dalle MCs sembra essere un evento distinto dalla de-granulazione e contribuisce allo sviluppo di infiammazione.

La serotonina può essere rilasciata separatamente dall'istamina ed è stata dimostrata anche la produzione di prostaglandine e leucotrieni dall'Acido Arachidonico (Kraeuter Kops S, Theoharides TC, Cronin CT, et al. Ultrastructural characteristics of rat peritoneal mast cells undergoing differential release of serotonin without histamine and without degranulation. *Cell Tissue Res* 1990; 262:415–24; Payan DG, Levine JD, Goetzl EJ. Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *J Immunol* 1984; 132:1601–4).

MCs, infiammazione cerebrale, disordini psichiatrici

Molti lavori hanno sottolineato l'importanza delle MCs nella fisiopatologia del cervello con particolare riguardo alla loro capacità di interagire con la glia, le cellule endoteliali e i neuroni (Silver, R., Curley, J.P., 2013. Mast cells on the mind: new insights and opportunities. *Trends Neurosci*; Skaper, S.D., et al. 2013. Mast cells, glia and neuro inflammation: partners in crime? *Immunology* 141, 314–327).

Lo stress e il CRF (Corticotropin-releasing factor) possono attivare le MCs cerebrali (Theoharides, T.C., et al. 2004a. Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 563–568).

Il ruolo potenziale delle citochine pro-infiammatorie cerebrali nella patogenesi delle malattie psichiatriche risale a osservazioni di circa 10 anni fa, e vi è evidenza crescente che esse accompagnano, in particolare, la Depressione Maggiore, il Disturbo Bipolare e l'Autismo (Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9:46-56; Almond M. Depression and inflammation: examining the link. *Current Psychiatry.* 2013; 12:24-32; Stertz L,

Magalhães PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry*. 2013; 26:19-26; Benedetti, S., Bucciarelli, S., Canestrari, F., Catalani, S., Mandolini, S., Marconi, V., Mastrogiacomo, A., Silvestri, R., Tagliamonte, M., Venanzini, R., Caramia, G., Gabrielli, F., Tonello, L. and Cocchi, M. (2014) Platelet's Fatty Acids and Differential Diagnosis of Major Depression and Bipolar Disorder through the Use of an Unsupervised Competitive-Learning Network Algorithm (SOM). *Open Journal of Depression*, 3, 52-73; Verri M, Pastoris O, Dossena M, et al. Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012; 25:345-353; El-Ansary A, Al-Ayadhi L. Neuroinflammation in autism spectrum disorders. *J Neuroinflammation*. 2012;9:265).

E' stato dimostrato che le MCs mediano l'espressione del comportamento ansioso, quindi svolgono un'azione che si correla e riconduce a livello centrale.

La manipolazione farmacologica con blocco dell'attività delle MCs a livello periferico non modifica il comportamento ansioso, mentre lo stesso intervento a livello centrale, lo modifica (Katherine M. Nautiyal, Ana C. Ribeiro, Donald W. Pfaff, and Rae Silver. *Brain mast cells link the immune system to anxiety-like behavior*. *PNAS* _ November 18, 2008. vol. 105 no. 46. 18053–18057).

E' stato anche dimostrato che le MCs contribuiscono al mantenimento del pool neurochimico del cervello (Katherine M. Nautiyal, Ana C. Ribeiro, Donald W. Pfaff, and Rae Silver. *Brain mast cells link the immune system to anxiety-like behavior*. *PNAS* _ November 18, 2008. vol. 105 no. 46. 18053–18057).

Lo studio testé citato (PNAS 2008) conferma i lavori che legano le MCs all'emozionalità.

In patologie significativamente mediate dalle MCs quali allergia alimentare, asma e intestino irritabile si riscontra una significativa relazione con i disordini d'ansia che, come è stato dimostrato, non devono essere confusi con gli stessi episodi ricorrenti (Lehrer PM, Isenberg S, Hochron SM (1993) Asthma and emotion: A review. *J Asthma* 30:5–21. Addolorato G, et al. (1998) Anxiety and depression: A common feature of health care seeking patients with irritable bowel syndrome and food allergy. *Hepato-gastroenterology* 45:1559–1564. Costa-Pinto FA, Basso AS, Russo M (2007) Role of mast cell degranulation in the neural correlates of the immediate allergic reaction in a murine model of asthma. *Brain Behav Immun* 21:783–790. Costa-Pinto, FA, et al. (2006) Neural correlates of IgE-mediated allergy. *Ann N Y Acad Sci* 1088:116–131. Metcalfe DD (2008) Mast cells and mastocytosis. *Blood* 112:946–956).

Le modificazioni comportamentali MCs dipendenti non sono riconducibili a un singolo mediatore delle MCs, ma piuttosto a interazioni multiple di tipo neurochimico.

Ricordiamone alcune:

L'istamina è coinvolta nella regolazione del ciclo sonno-veglia come lo è nel comportamento sessuale e nell'ansia (Brown RE, Stevens DR, Haas HL (2001) The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* 63:637–672. Donoso AO, Broitman ST (1979) Effects of a histamine synthesis inhibitor and antihistamines on the sexual behavior of female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 66:251–255. Ikarashi Y, Yuzurihara M (2002) Experimental anxiety induced by histaminergics in mast cell-deficient and congenitally normal mice. *Pharmacol Biochem Behav* 72:437–441. Zarrindast MR, Valizadegan F, Rostami P, Rezayof A (2008) Histaminergic system of the lateral septum in the modulation of anxiety-like behaviour in rats. *Eur J Pharmacol* 583:108–114. Dere E, et al. (2004) Changes in motoric, exploratory and emotional behaviours and neuronal acetylcholine content and 5-HT turnover in histidine decarboxylase-KO mice. *Eur J Neurosci* 20:1051–1058. Yuzurihara M, et al. (2000) Effects of drugs acting as histamine releasers or histamine receptor blockers on an experimental anxiety model in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 67:145–150).

La serotonina svolge le sue funzioni sia come trasmettitore con influenza sull'aggressione, l'appetito e l'umore sia come fattore trofico che influenza la neurogenesi, l'emozionalità e la memoria (Lucki I (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44:151–162. Gould E (1999) Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 21:46S–51S. Gaspar P, Cases O, Maroteaux L (2003) The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 4:1002–1012).

Un carenza di serotonina derivata dalle MCs può esitare in un'aumentata condizione di comportamento ansioso.

Anche le citochine originate dalle MCs possono esercitare effetti neuromodulatori sui sistemi di controllo del comportamento. TNF- α , IL-1 e IL-6 possono agire sull'asse HPA (Hypothalamic–pituitary–adrenal axis) e sul comportamento da stress (Dunn AJ (2000) Cytokine activation of the HPA axis. *Ann N Y Acad Sci* 917:608–617).

Altre sostanze derivate dalle MCs (TNF- α e prostaglandine D2) possono svolgere funzione neuro modulatoria contribuendo alla regolazione del sonno, del dolore e della temperatura corporea (Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T (2004) Cytokines and fever. *Front Biosci* 9:1433–1449. Krueger JM, Obal FJ, Fang J, Kubota T, Taishi P (2001) The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Ann N Y Acad Sci* 933:211–221. Ueno R, Honda K, Inoue S, Hayaishi O (1983) Prostaglandin D2, a cerebral sleep-inducing substance in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1735–1737. Ueno R, et al. (1982) Role of prostaglandin D2 in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6093–6097. Mong JA, et al. (2003) Estradiol differentially regulates lipocalin-type prostaglandin D synthase transcript levels in the rodent brain: Evidence from high-density oligonucleotide arrays and in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:318–32).

Fattori e/o condizioni che possono accrescere il numero di MCs nel cervello possono essere ritenute importanti dal punto di vista neurofisiologico e favoriscono un aumento dello stato di vigilanza (attenzione e cognizione) a livello centrale.

Molte evidenze indicano, invece, come l'infiammazione a livello cerebrale sia coinvolta nella patogenesi delle patologie neuro psichiatriche. Fattori neurogeni (CRF e NT) possono stimolare le MCs cerebrali al rilascio di mediatori infiammatori e neurotossici che alterano la permeabilità della barriera emato encefalica, stimolano la microglia e causano infiammazione focale.

La stimolazione combinata dei fattori neurogeni sulle MCs possono incrementare la permeabilità vascolare, influenzare i recettori delle MCs determinando effetti di tipo autocrino e paracrino.

Questi effetti MCs possono essere coinvolti nella patogenesi della "Brain Fog", del mal di testa e dell'autismo [(Theoharides, T.C., et al. Mastcells, brain inflammation and autism. Eur J Pharmacol (2015)].

MCs e Intestino

Le MCs rappresentano un'importante componente del tratto gastro enterico tutto ciò suggerisce e supporta il concetto che le MCs influenzino i processi immunitari e patologici a carico dell'intero.

In molte condizioni patologiche dell'apparato digerente il numero delle MCs è variabile nei vari siti anatomici intestinali e c'è evidenza di fenomeni di attivazione delle MCs con rilascio di mediatori.

Tutto ciò suggerisce e supporta il concetto che le MCs influenzino i processi immunitari e patologici a carico del tratto gastro enterico e che possano anche influenzare le normali funzioni dello stomaco e dell'intestino

(Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier PN, Trautwein C, Cetin Y, Maschek H, Stolte M, Gebel M, Manns MP (1996). Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology*. 28: 1-13; Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L (1996). Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*. 381: 75-77; Wallace JL, Granger DN (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J*. 10: 731-740; Furuta GT, Schmidt-Choudhury A, Wang MY, Wang ZS, Lu L, Furlano RI, Wershil BK (1997). Mast cell-dependent tumor necrosis factor alpha production participates in allergic gastric inflammation in mice. *Gastroenterology*. 113: 1560-1569; Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier PN, Trautwein C, Cetin Y, Maschek H, Stolte M, Gebel M, Manns MP (1996). Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology*. 28: 1-13; Wershil BK (2000). Mast cell-deficient mice and intestinal biology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 278: G343-G348; Andoh A, Fujiyama Y, Araki Y, Kimura T, Tsujikawa T, Bamba T (2001). Role of complement activation and mast cell degranulation in the pathogenesis of rapid intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Digestion*. 63: 103-107; Kolaczowska E, Seljelid R, Plytycz B (2001). Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell deficient WBB6F1 mice. *J Leukoc Biol*. 69: 33-42).

Molte sostanze rilasciate dalle MCs intestinali sono biologicamente attive e mediano numerosi processi come la regolazione del flusso ematico e della permeabilità epiteliale e endoteliale, la secrezione mucosale, la motilità del tratto gastro enterico, le risposte immunitarie ai vari antigeni, l'angiogenesi e lo sviluppo cancerogeno (Barczyk M, Debek W, Chyczewski L (1995). Mast cells in the gastrointestinal tract. *Rocz Akad Med Bialymst*. 40: 26-57; Stenton GR, Vliagoftis H, Befus D (1998). Role of intestinal mast cells in modulating gastrointestinal pathophysiology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 81: 1-15).

E' stato anche dimostrato un ruolo fisiologico delle MCs nella protezione dei tessuti dal danno infiammatorio e nella maturazione dell'intestino (Barczyk M, Debek W, Chyczewski L (1995). Mast cells in the gastrointestinal tract. *Rocz Akad Med Bialymst*. 40: 26-57; Stenton GR, Vliagoftis H, Befus D (1998). Role of intestinal mast cells in modulating gastrointestinal pathophysiology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 81: 1-15).

Per quanto riguarda il coinvolgimento delle MCs in quadri patologici possiamo ricordare l'ipersensibilità agli alimenti (Stenton GR, Vliagoftis H, Befus D (1998). Role of intestinal mast cells in modulating gastrointestinal pathophysiology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 81: 1-15) e, inoltre istamina e serotonina sono stati ritenuti markers importanti dell'attivazione delle MCs (Theoharides TC, Kops SK, Bondy PK, Askenase PW (1985). Differential release of serotonin without comparable histamine under diverse conditions in the rat mast cell. *Biochem Pharmacol*. 34: 1389-1398; Glavin GB, Hall AM (1991). Experimental gastric ulcer: Recent data suggest potential new therapeutic strategies. *Asia Pacific J Pharmacol*. 6: 331-339; Buckley MG, Coleman JW (1992). Cycloheximide treatment of mouse mast cells inhibits serotonin release. *Biochem Pharmacol*. 44: 659-664; Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L (1998). Mast cell degranulation induces delayed rectal allodynia in rats: role of histamine and 5-HT. *Dig Dis Sci*. 43: 727-737; Bueno L, Fioramonti J (1999). Effects of inflammatory mediators on gut sensitivity. *Can J Gastroenterol*. 13: 42A-46A; Jiang W, Kreis ME, Eastwood C, Kirkup AJ, Humphrey PP, Grundy D (2000). 5-HT (3) and histamine H (1) receptors mediate afferent nerve sensitivity to intestinal anaphylaxis in rats. *Gastroenterology*. 119: 1267-1275) e fattori patogenetici critici nello sviluppo dell'ulcera peptica (Cho CH (1994). The role of endogenous ulcerogenic mediators in the pathogenesis of peptic ulcer. *Life Sci*. 55: 1521-1535; Myers CP, Hogan D, Yao B, Koss M, Isenberg JI, Barrett KE (1998). Inhibition of rabbit duodenal bicarbonate secretion by ulcerogenic agents: histamine-dependent and -independent effects. *Gastroenterology*. 114: 527-535).

Le MCs, come accade per altre cellule coinvolte nei fenomeni immuno/infiammatori, possono manifestare la loro attività sia in senso positivo sia negativo e non è sempre facile riconoscere le modalità che gestiscono questi equilibri.

Rimane, tuttavia, chiara una modalità di intervento, cioè garantire la stabilizzazione delle MCs intestinali ad evitare situazioni di danno sia locale sia a distanza.

Sclerosi Multipla e Immunità innata

Attraverso ricerche di tipo genetico, immunitario e istopatologico in soggetti con sclerosi multipla hanno dimostrato che il ruolo fondamentale del sistema immunitario nella malattia. Risultati recenti hanno migliorato la comprensione del sistema immunitario innato e adattivo nella sclerosi multipla.

Microglia e macrofagi, sono le cellule immunitarie che dominano nelle lesioni della sclerosi multipla in entrambe le fasi recidivanti-remittenti e progressive della malattia. Queste cellule interagiscono con le cellule del sistema immunitario adattativo (come le cellule T e le cellule B), ma possono anche causare direttamente danni tissutali di tipo neuro infiammatorio.

I fagociti (**neutrofili, monociti, macrofagi, mast cells e cellule dendritiche**) sono i principali responsabili del danno mielinico e della rimozione della mielina, fenomeni che rappresentano il reperto più importante della Sclerosi Multipla e il livello di attività in queste lesioni può essere stadiato dalla presenza di prodotti di degradazione della mielina nei fagociti (Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol* 2009; 66: 739-53; Lassmann H, Raine CS, Antel J, Prineas JW. Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol* 1998; 86: 213-17).

Il danno prodotto dai fagociti non si limita alla mielina, bensì, colpisce gli assoni e il numero di queste cellule è positivamente associato all'entità del danno acuto degli assoni (Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000; 123: 1174-83).

La microglia e i macrofagi attivati nelle lesioni della sclerosi multipla rappresentano la fonte maggiore di stress-ossidativo (Fischer MT, Sharma R, Lim JL, et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* 2012; 135: 886-99) che rappresenta un meccanismo di danno che probabilmente contribuisce sia alla patologia della materia grigia e bianca nella sclerosi multipla (Haider L, Fischer MT, Frischer JM, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 2011; 134: 1914-24; Witte ME, Nijland PG, Drexhage JA, et al. Reduced expression of PGC-1 α partly underlies mitochondrial changes and correlates with neuronal loss in multiple sclerosis cortex. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 231-43). Risultati ottenuti in modelli sperimentali animali di encefalomielite autoimmune hanno dimostrato che la degenerazione assonale è indotta nei siti di accumulo dei fagociti e che bloccando l'attivazione di queste cellule nel CNS o bloccando il rilascio di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto si possono limitare i danni nell'assone (Nikić I, Merkler D, Sorbara C, et al. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med* 2011; 17: 495-99; Davalos D, Ryu JK, Merlini M, et al. Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat Commun* 2012; 3: 1227).

Questi fagociti così dannosi in queste circostanze possono divenire utili nelle fasi di recupero della patologia (Shechter R, London A, Varol C, et al. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med* 2009; 6: e1000113; Shechter R, Miller O, Yovel G, et al. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity* 2013; 38: 555-69).

Alcuni fagociti derivano da monociti periferici che mostrano un fenotipo attivato con una maggiore espressione di citochine pro-infiammatorie e di mediatori della matrice metallo proteinasi nella sclerosi multipla (Kouwenhoven M, Teleshova N, Ozenci V, Press R, Link H. Monocytes in multiple sclerosis: phenotype and cytokine profile. *J Neuroimmunol* 2001; 112: 197-205; Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126: 2738-49) e entrano nel CNS durante la formazione della lesione, mentre altri fagociti derivano dall'attivazione locale della microglia e spesso sono difficilmente differenziabili dai fagociti di origine ematica, nelle sezioni del tessuto. Di conseguenza, diviene difficile stabilire se queste due popolazioni cellulari hanno funzioni simili o divergenti nella sclerosi multipla attiva.

Altre ricerche su modelli animali danno supporto al fatto che i fagociti abbiano ruoli diversi durante l'infiammazione nel Sistema Nervoso Centrale in ordine alla loro differente origine. I fagociti di derivazione monocitaria sembra che inizino la demielinizzazione, mentre quelli derivati dalla microglia sembra che promuovano il recupero del danno (Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* 2014; 211: 1533-49).

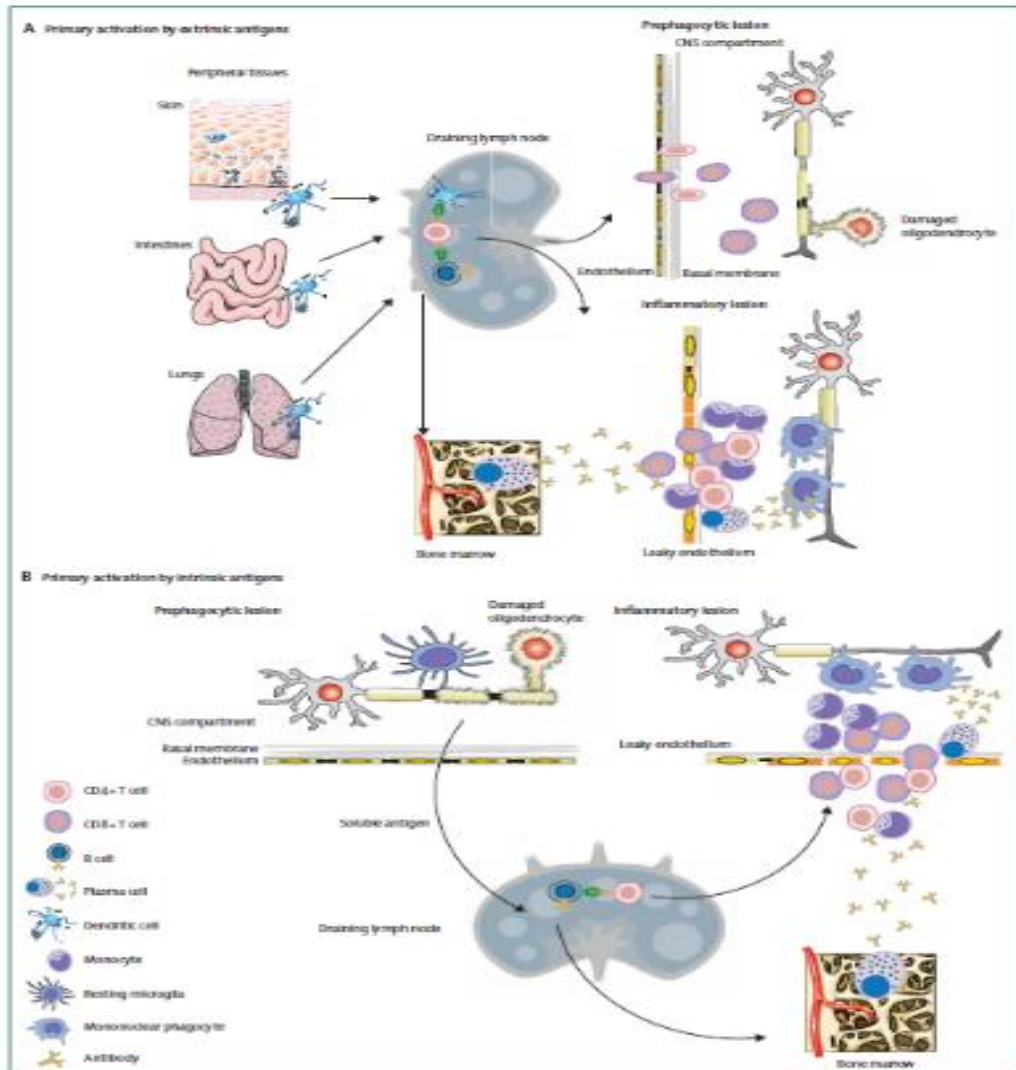


Figura 1. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis (Bernhard Hemmer, Martin Kerschensteiner and Thomas Korn, Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis, *The Lancet Neurology*, 14, 4, (406).

Sclerosi Multipla e Immunità Adattiva

L'attivazione di cellule T antigene specifiche e la loro differenziazione in sottogruppi di cellule T-helper potrebbero essere attivate nei tessuti linfoide associati con il sistema intestinale o con il sistema bronchiale (Berer K, Mues M, Koutrolos M, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 2011; 479: 538-41; Odoardi F, Sie C, Strey K, et al. T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. *Nature* 2012; 488: 675-79). Il microbiota, in particolare nell'intestino, potrebbe fornire segnali antigenici e adiuvanti per la differenziazione delle cellule T. L'identificazione di queste aree anatomiche come siti in cui le cellule T autore attive sono attivate offre nuove opportunità per indagare il ruolo dei segnali ambientali nella risposta immunitaria durante le malattie autoimmuni. I risultati di queste indagini dovrebbero contribuire a migliorare la comprensione del fatto che i fattori dello stile di vita (es. Il fumo, il consumo di cloruro di sodio e le abitudini nutrizionali) possano spiegare l'aumento dell'incidenza delle malattie autoimmuni (Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* 2013; 496: 518-22; Ascherio A, Munger KL, Lunemann JD. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 602-12; Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology* 2009; 73: 696-701; Hedstrom AK, Olsson T, Alfredsson L. High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. *Mult Scler* 2012; 18: 1334-36).

Anche se tutti i risultati sugli studi immunologici, ad oggi, suggeriscono che il danno mediato da anticorpi si verifica nelle lesioni della sclerosi multipla (legando gli anticorpi alla superficie delle strutture cellulari e con l'attivazione del complemento), l'antigene non è noto. Poiché i danni immuno mediati nei pazienti con sclerosi multipla sono focalizzati su oligodendrociti e mielina, le proteine di membrana espresse sulle cellule gliali potrebbero essere possibili bersagli per le risposte anticorpali. Tuttavia, la ricerca per i bersagli degli autoanticorpi della sclerosi multipla è difficile (Schirmer L, Srivastava R, Hemmer B. To look for a needle in a haystack: the search for autoantibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014; 20: 271-79).

Nel CNS, le cellule CD4+T riconoscono antigeni presentati da cellule di microglia, da macrofagi infiltranti e cellule B, tutte esprimendo molecole HLA (Human Leukocyte Antigen) di classe II. Al contrario, le cellule CD8 + T riconoscono antigeni presentati dalle molecole HLA di classe I, che vengono espressi in tutte le cellule nucleate, compresi oligodendrociti, astrociti e neuroni. I risultati delle analisi dei recettori delle cellule T hanno dimostrato che frazioni sostanziali di cellule CD4 + T e cellule CD8 + T sono state isolate dalle lesioni della sclerosi multipla e che nel CSF erano derivate dall'espansione clonale, suggerendo che le risposte delle cellule T specifiche dell'antigene contribuiscono alla malattia (Babbe H, Roers A, Waisman A, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; 192: 393-404; Babbe H, Roers A, Waisman A, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; 192: 393-404). Sebbene le cellule T espansive clonalmente nel parenchima del CNS di pazienti con sclerosi multipla potessero raggiungere l'autoantigene del CNS, queste cellule T potrebbero anche essere cellule T residenti di lunga vita di memoria, dirette contro comuni virus neurotropici che potrebbero risiedere nel CNS ed espandersi a causa di stimoli specifici di citochine indipendentemente dal loro antigene primario (Jiang X, Clark RA, Liu L, Wagers AJ, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 2012; 483: 227-31; Wakim LM, Woodward-Davis A, Bevan MJ. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 17872-9). Nonostante gli sforzi per identificare gli antigeni delle cellule T nelle sclerosi multipla, non sono noti gli epitopi riconosciuti dalle cellule T nell'area peri vascolare o nel parenchima del CNS. Nel CSF, la maggior parte delle cellule CD4 + T ha un fenotipo di memoria centrale (Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK, et al. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8389-94) e possono

produrre interferone γ . Poche cellule CD4 + T nel CSF producono interleuchina 17 (la citochina IL-17 ha attività pro-infiammatoria nelle patologie croniche autoimmuni dell'intestino, nell'artrite reumatoide e nella sclerosi multipla) e la loro proporzione sembra essere più alta nei pazienti in ricaduta acuta rispetto a quelli con sclerosi multipla senza attività di malattia (Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 2009; 132: 3329-41).

Microbiota Intestinale

Prima di affrontare le possibili relazioni fra Microbiota Intestinale e Sclerosi Multipla si ritiene utile riferire sinteticamente sul ruolo che esso gioca nel sistema uomo.

Le grandi comunità microbiche che si trovano all'interno o sul corpo umano svolgono un ruolo importante sia nella salute che nella malattia dell'uomo, considerato un organismo che comprende sia il genoma umano sia quello microbico (Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307:1915-20; Kinross JM, Darzi AW, Nicholson JK. Gut microbiome host interactions in health and disease. *Genome Med* 2011; 3:14; Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012).

Il microbiota intestinale funziona come una sorta di bioreattore che influenza l'assorbimento di nutrienti, il metabolismo degli alimenti, l'omeostasi energetica, forma le mucose, nonché interviene nelle risposte immunitarie sistemiche (Figura 2).

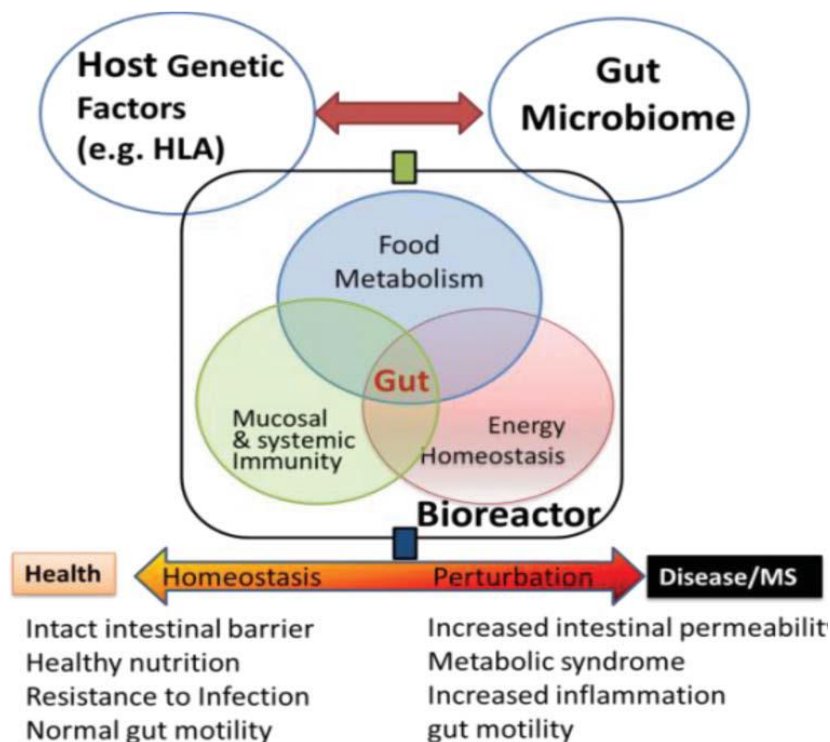


Figura 2. Ruolo del microbiota intestinale in salute e malattia, con riferimento anche alla Sclerosi Multipla (Shailesh K. Shahi, Samantha N. Freedman, and Ashutosh K. Mangalam. Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play. *GUT MICROBES* 2017, VOL. 8, NO. 6, 607-615).

Il microbiota intestinale aiuta a mantenere la condizione di equilibrio dello stato di salute in diversi modi, nello specifico, attraverso il mantenimento dell'integrità della barriera intestinale, l'inibizione della colonizzazione da parte di organismi patogeni, la regolazione della fisiologia dell'ospite e delle risposte immunitarie (Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2011; 32:256-64; Zhang K, Hornef MW, Dupont A. The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cell Microbiol* 2015; Blacher E, Levy M, Tatirovsky E, Elinav E. Microbiome- Modulated Metabolites at

the Interface of Host Immunity. *J Immunol* 2017; 198:572-80; Jarchum I, Pamer EG. Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. *Curr Opin Immunol* 2011).

Modificazioni del Microbiota Intestinale possono alterare il network di funzioni che garantiscono il mantenimento degli equilibri con ripercussioni sullo stesso microbiota e anche sistemiche.

Negli ultimi anni, diversi gruppi di ricerca hanno studiato il profilo microbiota intestinale fecale dei pazienti affetti da SM dimostrando che i pazienti con SM presentano disbiosi microbica intestinale con modifiche quali-quantitative delle specie batteriche intestinali rispetto ai controlli sani.

Subjects (n, M/F) sample type (country)	Treatment	Microbiome analysis method	Change in abundance between MS vs. HC (P-Phyla, F- family, G-genus)		Change in abundance between treated and untreated MS (P-Phyla, F- family, G-genus)			Ref
			Increased in MS vs HC	Decreased in MS vs HC	Increased in MS patients	Decreased in MS patients	Other of the study(s)	
RRMS (n = 31, 10M/ 21F) HC (n = 36, 14M/22F) Fecal samples (USA)		16S rRNA V3-5 Illumina MiSeq	<i>Pseudomonas</i> (G), <i>Mycoplana</i> (G), <i>Haemophilus</i> (G), <i>Blautia</i> (G), <i>Dorea</i> (G), <i>Peobacter</i> (G) and <i>Flavobacterium</i> (G)	<i>Prevotella</i> (G), <i>Parabacteroides</i> (G), <i>Adicreuzia</i> (G), <i>Coarseella</i> (G), <i>Lactobacillus</i> (G), <i>Coprococcus</i> (G), <i>Haemophilus</i> (G) <i>Butyrivimonas</i> (G)			No change in levels of <i>Fecalibacterium</i> (G)	1
RRMS (n = 60, 19M/41F) HC (n = 43, 6M/37F) Fecal samples (USA)	RRMS treated (disease-modifying treatment) vs untreated	16S rRNA V5-V5 Roche 454 and V4 by Illumina MiSeq	<i>Methanobrevibacter</i> (G) <i>Akkermansia</i> (G)	<i>Prevotella</i> (G)	<i>Prevotella</i> (G) <i>Sutteella</i> (G)	<i>Methanobrevibacter</i> (G) <i>Akkermansia</i> (G) <i>Sardina</i> (G)	No change in <i>Butyrivimonas</i> on treatment	2
RRMS (n = 20, 6M/ 14F) HC (n = 40, 20M/ 20F) Fecal sample (Japan)		16S rRNA V1-V2 Illumina MiSeq	<i>Bifidobacterium</i> (G) <i>Streptococcus</i> (G) <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> <i>Eggerthella lenta</i>	<i>Bacteroides</i> (G) (<i>B. stercoris</i> , <i>B. coprocola</i> , and <i>B. coprophilus</i>) <i>Fecalibacterium</i> (G) <i>Prevotella</i> (G) (<i>P. copri</i>) <i>Anaerostipes</i> (G) <i>Clostridium</i> (G) <i>Sutteella</i> (G) (<i>S. wadsworthensis</i>)				3
RRMS (n = 7) HC (n = 8) no gender data Fecal samples (USA)	# GA treated vs. untreated # vitamin D supplementation in MS patient vs. HC	Amplification of whole V1- V9 region of 16S rRNA followed by Phylochip analysis	<i>Ruminococcus</i> (G)	<i>Fecalibacterium</i> (G)	<i>Bacteroidaceae</i> (F) <i>Ruminococcus</i> (G) <i>Lactobacillaceae</i> (F) <i>Clostridium</i> (G)	<i>Fecalibacterium</i> (G)	Increase in <i>Akkermansia</i> (G) <i>Fecalibacterium</i> (G) <i>Coprococcus</i> (G) genes after Vitamin D supplementation	14
RRMS (n = 30) HC (n = 14) no gender data Fecal samples (UK)	Treated with interferon β -1b (n = 15) vs. untreated (n = 15)	No data			<i>Prevotella copri</i> DSM 18205		Firmicutes, Actinobacteria and Lentisphaerae differed between untreated MS patients, vs treated and HC.	15
Treatment Naive MS (n = 64) no gender data Fecal samples (No data)		16S rRNA V4 Illumina MiSeq	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Akkermansia muciniphila</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>			<i>A. calcoaceticus</i> and <i>A.</i> <i>muciniphila</i> induce proinflammatory response <i>P. distasonis</i> induce Tregs	16
Pediatric RRMS (n = 18, 8M/10F) HC (n = 17, 8M/9F) Fecal samples (USA)		16S rRNA V4 Illumina MiSeq	<i>Blautia</i> (G), <i>Desulfovibrio</i> (G), <i>Christensenellaceae</i> (F)	<i>Lachnospiraceae</i> (F) <i>Ruminococcaceae</i> (F)				17
Pediatric RRMS (n = 15, 7M/8F) HC (n = 9, 2M/7F) Fecal samples (USA)		16S rRNA V4 Illumina MiSeq					<i>Bacteroidetes</i> was inversely associated with Th17 for RRMS but not controls, <i>Fusobacteria</i> correlated with Tregs in HC.	18
Pediatric RRMS (n = 17, 7M/10F) Fecal samples (USA)	Pediatric RRMS followed over a mean 19.8 months to find microbiome associated with risk of relapse	16S rRNA V4 Illumina MiSeq					A shorter time to relapse was associated with absence of <i>Fusobacteria</i> and higher abundance of Firmicutes and Archaea Euryarchaeota	19
P-MS (n = 5), RRMS (n = 4), SPMS (n = 14) Non MS Controls (n = 21) Brain biopsies (Canada)		RNASeq analysis	<i>Proteobacteria</i> (P) (RRMS) <i>Actinobacteria</i> (P) (P-MS)	<i>Bacteriophage</i> with <i>Proteobacteria</i>				13

Tabella 1. Studi sul Microbiota nella Sclerosi Multipla: modificata da Shailesh K. Shahi, Samantha N. Freedman & Ashutosh K. Mangalam (2017): Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play, *Gut Microbes*, DOI: 10.1080/19490976.2017.1349041.

Uno studio (Branton WG, Lu JQ, Surette MG, Holt RA, Lind J, Laman JD, Power C. Brain microbiota disruption within inflammatory demyelinating lesions in multiple sclerosis. *Sci Rep* 2016) ha riportato la presenza di batteri in biopsie di cervelli di soggetti con Sclerosi Multipla. I campioni di biopsia della materia bianca cerebrale dei pazienti RRMS (Sclerosi Multipla Recidivante-Remittente) hanno mostrato una maggiore abbondanza di *Fusobacterium*, batterio anaerobico Gram-negativo dei *Fusobacterium* phyla (gruppo tassonomico gerarchicamente inferiore al regno e superiore alla classe).

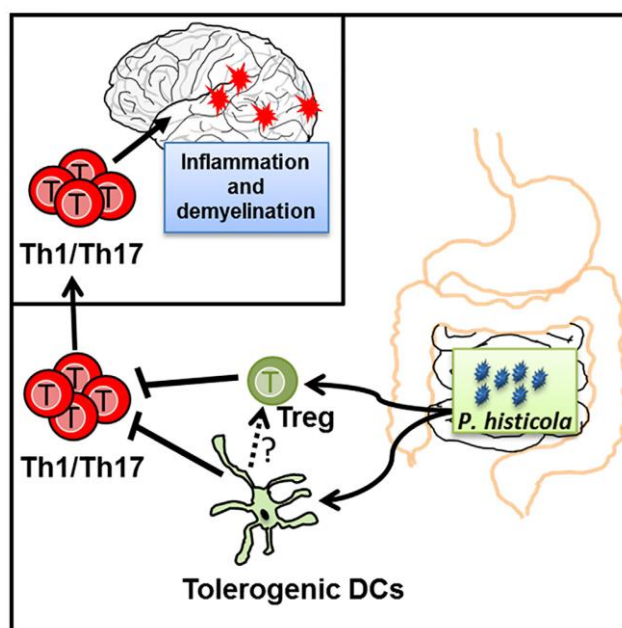
Il *Fusobacterium* è stato anche, precedentemente, ritrovato nei tessuti del cancro del colon e nella colite ulcerosa. Attualmente, non è chiaro se *Fusobacterium* sia patogeno o se cresce in un ambiente infiammatorio (Shailesh K. Shahi, Samantha N. Freedman & Ashutosh K. Mangalam (2017): Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play, *Gut Microbes*, DOI: 10.1080/19490976.2017.1349041).

All'interno di lesioni demielinizzate in soggetti con SM e in modelli di SM in primati non umani, è stato rilevato nei fagociti, il peptidoglicano costituente la parete cellulare batterica (PGN) (Schrijver, I. A. et al. *Bacterial peptidoglycan and immune reactivity in the central nervous system in multiple sclerosis*. *Brain* 124, 1544–1554 (2001); Visser, L. et al. *Phagocytes containing a disease-promoting Toll-like receptor/Nod ligand are present in the brain during demyelinating disease in primates*. *Am J Pathol* 169, 1671–1685 (2006). Inoltre, un componente del PGN, i muramil dipeptide, è un dimostrato induttore di NOD2 e dell'inflammasoma NLRP3 nella microglia umana (Ramaswamy, V. et al. *Inflammasome induction in Rasmussen's encephalitis: cortical and associated white matter pathogenesis*. *J Neuroinflammation* 10, 152 (2014), noto per influenzare la demielinizzazione (Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P. *Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics*. *Nature medicine* 21, 677–687 (2015).

In soggetti sani, l'intestino è costituito da una comunità batterica diversificata che è responsabile del mantenimento dell'equilibrio tra risposta immunitaria protettiva e antiinfiammatoria. La RRMS è una malattia infiammatoria in cui l'equilibrio immunitario è inclinato verso uno stato pro infiammatorio. E' ragionevole, quindi, ipotizzare che la disbiosi intestinale possa essere caratterizzata dal depauperamento di batteri responsabili dell'induzione/mantenimento delle risposte anti infiammatorie e/o l'arricchimento di batteri con la capacità di indurre risposte pro infiammatorie.

Le conclusioni più significative delle ricerche sulla condizione del Microbiota Intestinale nei soggetti con Sclerosi Multipla, rispetto ai controlli sani, i pazienti affetti da SM hanno a) disbiosi intestinale; b) ridotto phylum di Bacteroidetes con quantità inferiore di alcuni generi come Prevotella, Parabacteroides e Bacteroides (che possono indurre le cellule Tregs); c) maggiore quantità di certi Firmicutes come Akkermansia e Dorea (che possono metabolizzare mucina e indurre citochine pro-infiammatorie); d) esaurimento di Actinobacteria ceratinica come Adlercreutzia, Collinsella e Slackia (anti-infiammatorie) e Proteobatteri come la Sutterella; e) maggiore abbondanza di alcuni Proteobatteri come Acinetobacter calcoaceticus, Pseudomonas e Mycoplasma. Come è noto, il mantenimento delle tipologie batteriche che garantiscono l'omeostasi e l'equilibrio delle funzioni del microbiota e dell'intestino suggeriscono che il microbiota intestinale potrebbe sostenere uno stato di salute dell'ospite mantenendo l'omeostasi immunitaria. Le modifiche che perturbano questa omeostasi possono portare a conseguenze negative come le malattie infiammatorie. Complessivamente, gli studi sul microbiota dei soggetti con SM suggeriscono che c'è una deplezione di batteri con la capacità di indurre cellule con abilità immuno-regolatorie e arricchimento di batteri con la capacità di indurre risposte pro-infiammatorie. Ulteriori ricerche sono necessarie per determinare un ruolo del microbiota intestinale e dei loro metaboliti nella suscettibilità e protezione da SM.

Recentemente è stato identificato un batterio commensale, la *P. histicola*, nel tratto gastrointestinale superiore umano che esercitava un effetto sistemico soppressivo lontano dall'intestino tenue. La *P. histicola* ha inibito lo sviluppo di EAE nei topi transgenici HLA-DR3.DQ8, un modello preclinico di SM. E' stato osservato che il trattamento con *P. histicola* ha attenuato notevolmente l'infiammazione e la demielinizzazione e la ridotta permeabilità BBB, rispetto a batteri di controllo. E' stato ancora dimostrato che la *P. histicola* sotto regola le citochine pro-infiammatorie IFN γ e IL-17, induce CD4 + CD25 + FoxP3 + Tregs, DC tolerogeniche e macrofagi soppressivi. Queste osservazioni suggeriscono che la monoterapia di *P. histicola* è efficace quando somministrata a topi transgenici HLA, un modello della malattia cronica. Lo studio dimostra che un batterio commensale umano, proveniente dal tratto gastrointestinale superiore, possiede potenti caratteristiche protettive contro la SM e fornisce prova del principio che i batteri intestinali umani proteggono contro a la neuro infiammazione.



Modificato da: Ashutosh Mangalam et al. Human Gut-Derived Commensal Bacteria Suppress CNS Inflammatory and Demyelinating Disease. Cell Reports 20, 1269–1277, August 8, 2017

Un'ipotesi staminale

Le esperienze condotte dal nostro gruppo di ricerca negli ultimi anni sui disordini dell'umore nell'uomo ha condotto alla possibilità di riconoscere con grande precisione alcune tipologie dei Disordini dell'Umore attraverso una felice combinazione di biologia e matematica (Self Organizing Map), individuando negli acidi grassi delle piastrine alcuni elementi di criticità che caratterizzano il riconoscimento ad es. fra Depressione Maggiore e

Disordine Bipolare (Cocchi M. Tonello L., "Bio molecular considerations in Major Depression and Ischemic Cardiovascular Disease". Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry. 9: 2-11. 2010; Tonello L., Cocchi M., "The Cell Membrane: is it a bridge from psychiatry to quantum consciousness?". NeuroQuantology 2010; 1:54-60; Cocchi M., Tonello L., Gabrielli F., "Molecular Uniqueness of Major Depression: Biological Remarks and Theoretical Implications". Journal of Consciousness Exploration & Research |May 2012 | Vol. 3 | Issue 4 | pp. 380-391; Benedetti, S. , Bucciarelli, S. , Canestrari, F. , Catalani, S. , Mandolini, S. , Marconi, V. , Mastrogiacomo, A. , Silvestri, R. , Tagliamonte, M. , Venanzini, R. , Caramia, G. , Gabrielli, F. , Tonello, L. and Cocchi, M. (2014) Platelet's Fatty Acids and Differential Diagnosis of Major Depression and Bipolar Disorder through the Use of an Unsupervised Competitive-Learning Network Algorithm (SOM). Open Journal of Depression, 3, 52-73; Tonello L, Cocchi M, Gabrielli F and Tuszynski JA. On the possible quantum role of serotonin in consciousness. J. Integr. Neurosci. 14, 295 (2015); Cocchi M, Minuto C, Tonello L, Tuszynski JA. Connection between the Linoleic Acid and Psychopathology: A Symmetry-Breaking Phenomenon in the Brain? Open Journal of Depression, 2015, 4, 41-52; Massimo Cocchi, Chiara Minuto, Lucio Tonello, Fabio Gabrielli, Gustav Bernroider, Jack A. Tuszynski, Francesco Cappello, and Mark Rasenick. Linoleic acid: Is this the key that unlocks the quantum brain? Insights linking broken symmetries in molecular biology, mood disorders and personalistic emergentism. BMC Neurosci (2017) 18:38).

Nella selezione dei lavori sopra riportati si evince come l'Acido Linoleico, unitamente al Palmitico e all'Arachidonico rappresentino la criticità molecolare diagnostica, e in particolare la concentrazione di Acido Linoleico. Durante questo percorso di ricerca si è avuta l'opportunità di indagare un gruppo di soggetti con Sclerodermia (Cocchi M. Tonello L. Gabrielli F. (2011). Hypothesis of stem cells involvement in depressive disorders: A possible link to human evolution and to philosophical reflection? Human Evolution) scoprendo come fosse chiaro il legame della malattia con il fenomeno depressivo e come ne fosse altrettanto chiara l'origine della Sclerodermia dalla depressione e non viceversa, tutti i soggetti con Sclerodermia venivano inquadrati nel contesto della patologia dell'umore mentre nessuno dei soggetti indagati con depressione e bipolarismo avevano sintomi o segni di Sclerodermia.

Quando mi è stato chiesto di pensare alla Sclerosi Multipla e, come precedentemente descritto, si rivela sempre più intrigante e oscuro il risalire alle cause scatenanti, mi è

risovvenuto l'esperimento della Sclerodermia e la possibilità di un tentativo, forse anche logico, fra i tanti sui quali prestigiosi ricercatori hanno cercato un barlume di conoscenza. Il riconoscimento del legame fra sintomi psichiatrici e sclerosi multipla (SM) è stata conosciuta per merito di Charcot, il quale, ha dato la prima dettagliata descrizione patologica clinica della "sclerosi disseminata" nelle sue lezioni presso l'ospedale Salpetriere nel diciannovesimo secolo (Charcot JM. *Lectures on the diseases of the nervous system*. Philadelphia: Henry C Lea, 1879). Tra i sintomi psichiatrici notati da Charcot risaltavano: il ridere patologico, piangere, euforia, mania, allucinazioni e depressione. Infatti, la paziente Mademoiselle V di Charcot è stata descritta come soffrire di una forma di lypemania (o grave depressione), insieme a allucinazioni e paranoia (Butler MA, Bennett TL. *In search of a conceptualization of multiple sclerosis: a historical perspective*. *Neuropsychol Rev* 2003; 13:93–111). Negli anni 50 comincia la reale ricerca per stabilire la frequenza del fenomeno depressivo nella SM (Schiffer RB. *Disturbances of affect*. In: Rao SM, ed. *Neurobehavioral aspects of multiple sclerosis*. New York: Oxford University Press, 1990). Oltre ai fenomeni neurologici che caratterizzano la SM, il fenomeno depressivo sembra incidere per il 50%. Patten et al. (Patten SB, Beck CA, Williams JVA, et al. *Major depression in multiple sclerosis: a population-based perspective*. *Neurology* 2003; 61:1524–7) hanno riportato un tasso di prevalenza di 12 mesi del 25,7% per la depressione maggiore nelle persone con S M nell'età fra i 18-45 anni. Di ulteriore preoccupazione è la constatazione che l'ideazione suicidaria è relativamente comune tra le persone affette da SM e che la depressione nelle persone con SM spesso non viene rilevata e trattata.

Una Considerazione Sperimentale

Queste informazioni sono sufficienti per avanzare la proposta di riconsiderare la tipologia del Disordine dell'Umore, compresa l'ideazione suicidaria, alla luce dei risultati descritti e ottenuti con l'utilizzo di una rete neurale artificiale, appunto la Self Organizing Map di Kohonen (Cocchi M., Tonello L., Tsaluchidu S., Puri B.K.. "The use of artificial neural networks to study fatty acids in neuropsychiatric disorders", *BMC Psychiatry* 2008, 8 (Suppl 1) :S3).

La suddetta valutazione consentirà di stabilire esattamente la tipologia di disordine depressivo che caratterizza la SM in un campione ampiamente rappresentativo di soggetti con tale patologia, consentirà anche di capire se realmente questa malattia si accompagna a un consistente numero di soggetti con ideazione suicidaria. Le evidenze molecolari che costituiranno il reperto biologico, come in tutte le altre sperimentazioni, consentiranno una serie di ragionamenti assolutamente utili per capire se nei soggetti con SM sia possibile la produzione di un neurone dalla staminale, verosimilmente cutanea, e verificare se sarà possibile trovare l'errore che possa legare la caratteristica depressiva alla SM, così come prospettato nel caso della Sclerodermia. Anche nella "depressione" è imponente il fenomeno infiammatorio a partenza, verosimilmente, intestinale, così come sembra esserlo nella SM. La possibilità di un percorso sperimentale che preveda lo studio dei rapporti fra *Sclerosi Multipla, Disordini dell'Umore, Infiammazione, Microbiota Intestinale e Cellule Staminali dovrebbe, con buona possibilità, consentire un passo sostanziale nella ricerca della verità eziopatogenetica di questa terribile malattia.*

A questo scopo si dovrà costruire un coeso gruppo di ricerca con le competenze che consentano di seguire il sottile "Filo di Arianna".