

Microbiota intestinale e nasale nella malattia di Parkinson

Federico Angelo Cazzaniga¹, Alessandra Consonni², Chiara Maria Giulia De Luca¹, Arianna Ciullini¹, Alessio Di Fonzo³, Fulvio Baggi², Fabio Moda¹

¹Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Unità di Neurologia 5 - Neuropatologia, Milano, Italia

²Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Unità di Neurologia 4 - Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Milano, Italia

³Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Unità di Neurologia, Milano, Italia

ABSTRACT

Gut and nasal microbiota in Parkinson's disease.

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative condition characterized by a series of symptoms that anticipate overt disease. In particular, rapid eye movement (REM) sleep behavior disorders, intestinal problems and olfactory impairment are the most frequent prodromal signs of the disease. Compelling evidence suggests that, among other factors, the microbiota might play an important role in the onset and progression of PD. While several findings confirmed that there might be an important link between intestinal microbiota alterations and PD onset, little is known about the potential contribution of the nasal microbiota. Here, we will describe the latest findings on this topic by considering that more than 80% of patients with PD develop remarkable olfactory deficits in their prodromal disease stage. Therefore, the nasal microbiota might contribute to PD, eventually boosting the intestinal microbiota in promoting disease onset.

Parole chiave: malattia di Parkinson, microbiota nasale, α -sinucleina

INTRODUZIONE

Gli ecosistemi microbici umani che comprendono batteri, *archaea*, eucarioti e virus colonizzano diversi habitat del corpo tra cui la pelle, il tratto urogenitale, gastrointestinale e respiratorio. Il termine microbiota definisce la complessa popolazione di microrganismi localizzati in specifiche nicchie ecologiche, mentre l'intero patrimonio genetico viene definito microbioma; sebbene i due termini abbiano significati diversi, microbiota e microbioma vengono spesso usati in modo intercambiabile dalla comunità scientifica. Grazie a metodologie avanzate di sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) (1) è oggi possibile isolare e sequenziare, con relativa facilità, il DNA di comunità microbiche specifiche presenti in un determinato tessuto.

In particolare, il sequenziamento del gene 16S rRNA, che codifica per la subunità 16S (componente della subunità 30S di un ribosoma procariotico), permette di identificare, classificare e quantificare le diverse specie batteriche. Il gene 16S rRNA è altamente conservato, ma contiene nove regioni ipervariabili (V1-V9) che fungono da impronte digitali per le diverse specie. Il grado di conservazione varia ampiamente tra le regioni ipervariabili, con regioni più conservate correlate a tassonomia di livello superiore e regioni meno conservate a livelli inferiori, come genere e specie. Per questo motivo, utilizzando primer di Polymerase Chain Reaction (PCR) specifici per le diverse regioni ipervariabili, è possibile amplificare porzioni del gene e, tramite il successivo sequenziamento, discriminare la composizione batterica specifica di quel campione (2,3).

Corrispondenza a: Fabio Moda, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, via Celoria 11, 20133 Milano, E-mail: fabio.moda@istituto-besta.it

Ricevuto: 10.06.2022

Revisionato: 28.06.2022

Accettato: 13.07.2022

Publicato on-line: 27.07.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.054

Negli ultimi anni è stato dimostrato che batteri commensali hanno un ruolo centrale per le funzioni immunologiche, metaboliche e di integrità dell'organismo (4). Per questo motivo, in questa rassegna vengono riassunte le conoscenze attuali sul ruolo fisiopatologico del microbiota intestinale nella malattia di Parkinson e viene discussa la possibilità che anche il microbiota nasale possa contribuire all'insorgenza e alla progressione della malattia.

IL MICROBIOTA INTESTINALE

La maggior parte dei microrganismi che costituiscono il microbiota umano risiede nell'intestino dove è ormai assimilato ad un vero e proprio organo. Il microbiota batterico intestinale è caratterizzato da sei principali phyla: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Fusobacteria* (5) e partecipa a numerose funzioni fisiologiche, incluso lo sviluppo e il rafforzamento del sistema immunitario, il metabolismo energetico, le funzioni endocrine e intestinali. Inoltre, i microrganismi della flora autoctona inibiscono e prevengono l'invasione di agenti patogeni esogeni e provvedono a funzioni essenziali, quali la biosintesi di vitamine del gruppo B e di vitamina K, nonché la degradazione di carboidrati complessi derivanti da fibre vegetali non digeribili. Il microbiota intestinale è composto da $14 \times 10^{13}/10^{14}$ microrganismi con un patrimonio genetico totale di circa $2,3 \times 10^6$ geni, cento volte superiore al valore del genoma umano (6). Questa flora intestinale comprende tra le 500 e le 1000 specie batteriche; la maggiore affluenza si ha nel tratto del colon dove ci sono dalle 160 alle 500 specie differenti, ognuna con peculiari caratteristiche microbiologiche, di cui la stragrande maggioranza è rappresentata da batteri anaerobi stretti in grado di produrre energia e nutrienti per l'ospite e le comunità simbiotici (7). Anche se con distribuzione diversa a seconda del tratto, il microbiota è dominato dai phyla *Firmicutes* e *Bacteroidetes* che rappresentano insieme il 70% del totale, e dai *Bacteroides*, *Faecalibacterium* e *Bifidobacterium* come generi più abbondanti (8,9). La composizione del microbiota è specifica per ogni individuo e varia dalla fase pre-natale, a quella neonatale e nei primi tre anni di vita. Successivamente, si stabilizza rimanendo pressoché inalterata durante il periodo adulto (10-13). Dall'infanzia all'età avanzata, dove si osserva un aumento del rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*, importanti fattori possono influenzare la diversità del microbiota come: il genere, l'indice di massa corporea, il tipo di dieta, l'area geografica, la presenza di agenti antibatterici o pre/probiotici e il trattamento con specifici farmaci (inibitori di pompe protoniche, cortisonici e contraccettivi orali) (14-16). L'equilibrio tra le specie batteriche che compongono il microbiota viene definito "eubiosi" ed è indispensabile per la salute. Alcuni studi epidemiologici hanno dimostrato come diversi disturbi gastrointestinali, come malattie infiammatorie intestinali, malattie metaboliche come il diabete, malattie autoimmuni come la celiachia possano alterare questo equilibrio e provocare quindi "disbiosi" con conseguente modificazione della distribuzione e

della composizione del microbiota (17-20). In particolare, un'alterazione dell'equilibrio nell'ecosistema microbico intestinale tra batteri simbiotici (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Enterococcus spp*, *Propionibacterium spp* e *Peptostreptococcus spi*) e opportunisti (*Bacteroides*, *Bacilli*, *Clostridia*, *Enterobacteriales*, *Peptococcus spp*, *Stafilococcus spp* e lieviti) è associata a disordini gastrointestinali.

Interazioni tra microbiota intestinale e sistema nervoso centrale

La disbiosi può anche essere alla base di condizioni neurologiche complesse. È oggi noto che la composizione del microbiota intestinale può influenzare alcune funzioni del sistema nervoso centrale (SNC). Questo è possibile grazie all'esistenza di un collegamento morfo-funzionale bidirezionale tra mucosa intestinale (con coinvolgimento del sistema nervoso enterico, SNE) e SNC che va a creare il cosiddetto asse intestino-cervello in cui i segnali sono veicolati attraverso il nervo vago o le innervazioni spinali. Il SNC può modulare la motilità, l'immunità, la permeabilità e la secrezione di muco dell'intestino attraverso il sistema nervoso autonomo, o attivare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e indurre una iperproduzione di cortisolo, con una conseguente riduzione dell'espressione di proteine di adesione nell'epitelio intestinale e un incremento della sua permeabilità (21). In parallelo, il microbiota intestinale può inviare segnali, non solo attraverso il SNE, ma, grazie alla capacità dei batteri intestinali di sintetizzare specifici neurotrasmettitori e metaboliti, anche attraverso il flusso sanguigno e la barriera ematoencefalica (22-25). Tra i principali neurotrasmettitori ci sono l'acido g-amminobutirrico (GABA) sintetizzato da *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, la dopamina e noradrenalina sintetizzate da *Bacillus* e *Escherichia* e la serotonina prodotta da *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Klebsiella*. Tra i metaboliti, un importante ruolo viene svolto dagli acidi grassi a catena corta (SCFA). Gli SCFA sono i principali metaboliti prodotti dalla fermentazione batterica delle fibre alimentari, con concentrazioni totali di 50-200 mM nel colon, e possono legare specifici recettori immunologici e, successivamente, essere utilizzati come fonti di energia, come regolatori dell'espressione genica per l'integrità epiteliale e per interazioni immunologiche (26). I tre principali SCFA (acetato, propionato e butirato) (27) svolgono, inoltre, specifiche funzioni in ambito neurologico, come la stimolazione di cellule enterocromaffini per la produzione di serotonina, il controllo della maturazione e dello sviluppo della microglia, la modulazione del fattore di crescita nervoso (NGF) e del fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali (GDNF), importanti per la crescita, la sopravvivenza e la differenziazione dei neuroni e delle sinapsi del SNC. In particolare, l'acetato altera i livelli dei neurotrasmettitori glutammato, glutammina e GABA nell'ipotalamo, mentre il propionato e il butirato agiscono sull'equilibrio neurochimico cerebrale, regolando i livelli di espressione della triptofano-5-idrossilasi 1, enzima importante per la sintesi della serotonina, e della tirosina idrossilasi che è coinvolta nella biosintesi di dopamina, noradrenalina e

adrenalina.

Partendo da queste evidenze, che sottolineano la stretta comunicazione tra il SNC e l'intestino, recenti studi hanno descritto come la disbiosi del microbiota intestinale sembri essere implicata in patologie comportamentali e neurologiche, come la depressione, il disturbo dello spettro autistico (ASD), la malattia di Alzheimer (AD), la sclerosi multipla (SM), la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), le malattie da prioni e PD (28-34).

MALATTIA DI PARKINSON

La PD è una malattia neurodegenerativa frequente, che colpisce circa 1/100 delle persone nella sesta decade di vita. La PD si manifesta con disturbi motori, come la lentezza del movimento, rigidità e tremore. Tuttavia, prima della comparsa di questi sintomi, la malattia presenta una fase prodromica che è invece caratterizzata dalla comparsa di sintomi non motori che comprendono disturbi del sonno (iRBD), stipsi, depressione e perdita dell'olfatto.

Una delle caratteristiche neuropatologiche tipiche della PD riguarda la perdita dei neuroni dopaminergici della sostanza nera *pars compacta* (35). La perdita di queste cellule, e la conseguente riduzione di rilascio di dopamina, porta ad una disfunzione di altre strutture cerebrali, tra cui i nuclei della base, le cui funzioni sono necessarie per l'inizio e il controllo del movimento. Nei neuroni dopaminergici sono presenti aggregati proteici sia nel citoplasma (corpi di Lewy) che nei prolungamenti neuronali (neuriti di Lewy) formati principalmente da α -sinucleina (α -sin) mal-ripiegata che viene chiamata α -sin^D. I corpi di Lewy si trovano anche in altre regioni cerebrali, come i nuclei dorsali motori del nervo vago, il locus *coeruleus* e la corteccia entorinale. La causa della degenerazione neuronale e della formazione di aggregati di α -sin^D non è ancora chiara (36). Lo studio dei casi famigliari ha portato ad identificare fattori di rischio genetici, alcuni ad alta penetranza ma molto rari (ad esempio le mutazioni del gene *SNCA* che codifica per la proteina α -sin), altri invece più frequenti nella popolazione ma a penetranza ridotta (varianti del gene *GBA* e *LRRK2*) (37).

Evidenze scientifiche crescenti dimostrerebbero che l' α -sin^D, oltre a formare gli aggregati proteici intraneuronali caratteristici della PD, abbia proprietà patologiche vere e proprie e sia coinvolta nell'insorgenza e progressione della malattia. Gli aggregati di α -sin^D si propagano tra i neuroni. Quando invadono un nuovo neurone, gli aggregati di α -sin^D sono in grado di interagire con α -sin normale (che abbonda a livello delle sinapsi) inducendone un cambiamento conformazionale che la trasforma in α -sin^D (38,39). Quest'ultima entrerà quindi a far parte del deposito proteico. Attraverso questo meccanismo l' α -sin^D si propaga in modo molto efficiente nel SNC.

Tuttavia, oltre ad essere presente nei neuroni del SNC, l' α -sin^D è stata identificata anche nel SNE, soprattutto in fasi iniziali di malattia e sembrerebbe contribuire all'insorgenza di disturbi gastrointestinali, tra cui costipazione e compromissione della funzione motoria del colon. Una delle ipotesi relative all'eziopatogenesi

della PD riguarda proprio la possibilità che alterazioni del microbiota intestinale possano promuovere la formazione di α -sin^D a livello locale (mucosa intestinale) e che questa possa poi raggiungere il cervello, attraverso l'asse intestino/cervello, provocando le alterazioni cliniche e neuropatologiche tipiche della malattia. A supporto di questa ipotesi, i pazienti con PD hanno depositi di α -sin^D nel SNE e un microbiota intestinale alterato rispetto ai soggetti sani. Per questo motivo, si sono intensificati gli studi di correlazione tra microbiota intestinale e PD. Come descritto più avanti, interessanti scoperte hanno mostrato che α -sin^D prima di depositarsi nei neuroni del SNC, si accumula sia nel plesso enterico dello stomaco che nel bulbo olfattivo (40). Per questo motivo è stato proposto che gli eventi iniziali della PD, tra cui la formazione di α -sin^D, coinvolgano strutture periferiche (intestino e naso) e che da qui la patologia raggiunga poi il cervello (teoria del "doppio colpo") (40). Nei due paragrafi successivi sono descritte le correlazioni esistenti tra microbiota intestinale e microbiota nasale e PD, alla luce delle più recenti scoperte scientifiche.

Microbiota intestinale e malattia di Parkinson

Come precedentemente accennato, l' α -sin non è espressa solo nel SNC, ma è anche prodotta e rilasciata dai neuroni del SNE e ha un ruolo fondamentale nel rilascio/assorbimento di neurotrasmettitori (41). Aggregati patologici di α -sin^D sono stati osservati in biopsie di tessuti gastrointestinali di pazienti con PD; questo dato è di supporto all'ipotesi che la PD possa avere origine dall'intestino (42). Inoltre, l' α -sin^D è stata ritrovata anche in ghiandole salivari, esofago e stomaco, organi potenzialmente coinvolti nella sintomatologia non motoria comune nella PD, come ipersalivazione, disfagia, svuotamento gastrico ritardato e gastroparesi (43). Studi pubblicati da Braak et al. nel 2003 (44) e Hawkes et al. nel 2007 (40) supportano il coinvolgimento del tratto gastrointestinale nello sviluppo e progressione della PD, suggerendo che l' α -sin^D possa originarsi nel sistema gastrointestinale e che poi, tramite trasporto retrogrado lungo le proiezioni neuronali proprie del SNE, raggiunga il SNC e da qui si diffonda in maniera caudo-rostrale dal tronco cerebrale a diversi distretti nervosi. Oltre ad aver dimostrato la presenza di aggregati di α -sin^D nel nervo vago (45), studi condotti su modelli animali di PD hanno dimostrato che l'inoculo di α -sin^D nel tratto gastrointestinale dei topi è in grado di indurre deposizione di α -sin^D nel SNC (46,47). La presenza di un microbiota intestinale sano non solo ha effetti benefici sulle strutture proprie del sistema gastrointestinale, ma promuove l'integrità della barriera emato-encefalica, mediante regolazione delle proteine coinvolte nelle giunzioni occludenti, e produzione di acidi grassi a catena corta. Una condizione di disbiosi a livello del microbiota può essere associata ad un aumento dell'abbondanza relativa di specie batteriche detrimental, con conseguente compromissione dell'integrità intestinale e produzione di tossine batteriche ad attività infiammatoria [come ad esempio il lipopolisaccaride (LPS)] (48). In particolare, è noto come LPS interagisca a livello periferico con le cellule del sistema immunitario,

stimolando il rilascio di citochine pro-infiammatorie; inoltre, è stato dimostrato come LPS possa indurre la formazione di α -sin^D in modelli sperimentali (49). In seguito all'interazione eteromolecolare tra LPS e α -sin si osserva la formazione di α -sin^D con proprietà strutturali e patologiche ben definite (50). Ulteriori dati suggeriscono che anche altre molecole batteriche, in particolare le proteine amiloidi, possono promuovere la formazione dell' α -sin^D. Il microbiota intestinale infatti produce diverse proteine "amiloidi", tra cui la proteina "curl", espresse in abbondanza da ceppi intestinali come *Escherichia coli*. In topi transgenici che sovraesprimono α -sin umana, è stato dimostrato che la colonizzazione con *Escherichia coli* è in grado di promuovere formazione di α -sin^D in intestino e cervello (51,52).

Oltre alle problematiche strutturali, nel contesto della PD è importante sottolineare come il microbiota intestinale possa interferire con altri processi patologici importanti legati alla malattia. È noto, infatti, come i batteri intestinali (in particolare *Prevotella*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Ruminococcus*) contribuiscano in modo determinante alla biodisponibilità nel SNE e nel SNC della dopamina (neurotrasmettitore chiave nella PD). Diversi studi associano cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale e nella produzione di dopamina con la patogenesi e la manifestazione clinica dei pazienti (50). Come riportato sopra, la fisiopatologia della PD è attribuita ad accumulo di α -sin^D che interferisce con la trasmissione sinaptica dei neuroni dopaminergici e quindi con conseguente riduzione di biodisponibilità di dopamina. La perdita di dopamina a livello del sistema nervoso periferico (SNP) e SNE si manifesta con malfunzionamenti gastrointestinali, tra cui ritardato svuotamento gastrico e dismotilità intestinale. Inoltre, la neurodegenerazione dei neuroni dopaminergici nella via nigro-striatale porta a sintomi motori, tra cui bradicinesia, tremori a riposo e instabilità posturale. Questi sintomi motori sono stati direttamente associati a cambiamenti della composizione microbica nell'intestino (53). È stato dimostrato che alcuni ceppi batterici intestinali esercitano effetti neuroprotettivi sui neuroni dopaminergici per attenuare la perdita di dopamina, mentre altri possono esercitare effetti negativi stimolando ulteriormente risposte infiammatorie attraverso la produzione di endotossine. Nel complesso quindi si osserva riduzione della condizione di eubiosi intestinale nei pazienti PD, a favore di uno stato di disbiosi con elevati livelli relativi di batteri potenzialmente patologici. Sono stati eseguiti studi di genotipizzazione molecolare delle specie microbiche presenti nel tratto gastro-intestinale in pazienti PD, con risultati abbastanza comparabili, anche se sono presenti alcune discrepanze. In particolare, tutti i principali *phyla* batterici presentano alterazioni nella composizione relativa, a livelli diversi, nei pazienti PD; i cambiamenti nelle specie microbiche intestinali possono essere considerati biomarcatori prodromici indicanti l'esordio precoce della malattia (54). Sono stati descritti livelli aumentati per *Akkermansia muciniphila*, *Enterobacteriaceae*, *Eggerthella*, *Oscillibacter*, *Escherichia/Shigella*, *Lachnospiraceae* e *Streptococcus*

e una diminuzione per *Roseburia*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium ed Eubacterium* biforme (55). Inoltre, i livelli di *Enterococcus*, *Bifidobacterium* e *Ruminococcus* sono risultati elevati mentre *Prevotella*, *Bacteroides* e *Clostridium* sono stati osservati diminuiti nei pazienti PD (56). I risultati riguardanti l'abbondanza di *Lactobacillus* sembrano essere, invece, discordanti in letteratura, dove vengono descritti sia incrementi che diminuzioni di questo genere microbico nel contesto della PD (57). Le possibili variazioni nella composizione di specifiche famiglie/generi batterici nella PD sono riassunte nella Tabella 1.

In conclusione, importanti marcatori patologici nel tratto gastrointestinale possono essere attribuiti a cambiamenti microbici intestinali con associato aumento dell'infiammazione intestinale, secrezione di LPS e accumulo di α -sin^D; i pathway retrogradi dell'innervazione vagale trasferiscono queste alterazioni a livello del SNC, portando quindi allo sviluppo degli effetti neurodegenerativi a carico dei neuroni dopaminergici, propri della PD.

Gli studi che hanno dimostrato un legame tra lo stato del microbiota intestinale e i processi neurodegenerativi in patologie neurologiche come la PD rappresentano sicuramente un significativo passo avanti nella comprensione dei complessi meccanismi patogenetici. Comprendere il ruolo del microbiota intestinale nella modulazione dell'attività e della biodisponibilità della dopamina sia a livello del SNP che del SNC potrà aiutare ad identificare nuove terapie e ottimizzare i metodi disponibili per prevenire, ritardare o ripristinare i deficit dopaminergici nei disturbi neurologici o metabolici.

Microbiota nasale e malattia di Parkinson

Lo studio del microbiota nasale e di una sua potenziale correlazione con la PD è ancora agli albori. Una ricerca in banche dati effettuata specificamente per questa rassegna ha fornito solo quattro lavori su questa tematica (49-52). Pereira et al. hanno analizzato il microbiota nasale di 69 pazienti con PD e 67 controlli sani tramite sequenziamento 16S NGS (regione V1 e V3). I campioni sono stati prelevati tramite tampone nasale effettuato nella regione tra il setto e il turbinato medio. Queste analisi hanno permesso di identificare un totale di 553 generi, 177 famiglie, 96 ordini, 49 classi e 28 *phyla*. Il genere presente maggiormente in entrambi i gruppi era *Corynebacterium* seguito da *Propionibacterium*, *Moraxella*, *Staphylococcus* e *Burkholderia*. Nonostante la varietà di microrganismi riscontrati, non è stato possibile rilevare nessuna differenza in termini di diversità alfa o beta tra pazienti con PD e gruppo controllo (58).

Heintz-Buschart et al. (50), tramite sequenziamento NGS per 16S rRNA, 18S rRNA e metagenomica shotgun (sequenziamento dell'intero pool di DNA estratto direttamente dal campione di interesse, ovvero analisi delle sequenze sia dell'ospite che di tutti i microrganismi, inclusi batteri, *archaea*, funghi, virus e protozoi), hanno analizzato il microbiota di campioni di lavaggio nasale di 76 pazienti con PD e 78 controlli sani. Questo lavoro ha evidenziato una elevata eterogeneità tra campioni a tutti i livelli tassonomici, con però una sola unità tassonomica

Tabella 1

Alterazioni dei livelli di taxa (specificati per phylum, famiglia e genere) nel microbiota intestinale di pazienti affetti da malattia di Parkinson

Phylum	Famiglia	Genere	Livello	Ref
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	↑	(56)
Firmicutes	Enterococcaceae	Enterococcus	↑	(66)
	Lactobacillaceae	Lactobacillus	↓	(57,67)
				↑
	Clostridiaceae	Clostridium	↓	(68)
	Lachnospiraceae	Ruminococcus	↑	(69)
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiaceae	Akkermansia	↑	(70)
Bacteroidetes	Prevotellaceae	Prevotella	↓	(50)
	Bacteroidaceae	Bacteroides	↓	(50)

operativa (OTU) del genere *Corynebacterium* comune a tutti i soggetti. Anche in questo studio non sono state rilevate differenze significative in grado di discriminare i pazienti PD dai controlli. Ulteriori analisi statistiche, considerando 70 dati antropometrici, hanno permesso tuttavia di rilevare che sesso e altezza dei soggetti fossero in grado di influenzare la comunità procariotica. Infine, confronti tra pazienti PD in terapia farmacologica con levodopa (L-DOPA) e pazienti non in trattamento hanno mostrato una maggiore abbondanza relativa di Bacillaceae nei pazienti trattati (59).

Nel 2021 Pal et al. (51) hanno analizzato la comunità batterica presente nella cavità nasale di 30 pazienti con PD e 28 soggetti sani, tramite sequenziamento multi-amplicone del gene 16S rRNA (regioni V1-V9). In questo caso il campionamento è stato effettuato a livello della fessura olfattiva tramite l'utilizzo di un endoscopio rigido. I risultati di queste analisi si sono rivelati decisamente più promettenti rispetto ai dati dei primi due studi. In particolare, è stato osservato che, rispetto ai controlli, i pazienti PD tendevano ad avere quantità maggiori di specie pro-infiammatorie tra cui *Moraxella catarrhalis* e *Ralstonia insidiosa*. In aggiunta, i pazienti con quantità maggiori di *Moraxella catarrhalis* e altri batteri pro-infiammatori tendevano a mostrare sintomi di PD più gravi. Oltre ad alti livelli di batteri pro-infiammatori, i pazienti tendevano anche ad avere quantità inferiori di batteri con proprietà anti-infiammatorie, tra cui *Blautia wexlerae*, *Lachnospira pectinoschiza* e *Propionibacterium humerusii*, noti per essere in grado di produrre SCFA nell'ambiente gastrointestinale. L'ulteriore impiego di analisi mediante Machine Learning ha permesso di identificare otto taxa caratteristici dei pazienti PD: *Escherichia albertii*, *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Macroccoccus brunensis*, *Ralstonia insidiosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Burkholderia xenovorans* e *Acinetobacter guillouiae*. Infine, valutazioni cliniche

come la gravità dei sintomi motori [valutati tramite la scala Movement Disorder Society - Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) che è costituita da diversi quesiti divisi in quattro sezioni che riguardano: esperienze non motorie della vita quotidiana, esperienze motorie di vita quotidiana, esame motorio e complicanze motorie associate alla PD] e le funzioni olfattive sono risultate positivamente correlate con *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus epidermidis* e con la specie batterica commensale *Peptoniphilus asaccharolyticus*. I risultati di questo studio hanno permesso di individuare un ambiente microbico pro-infiammatorio e disbiotico nella cavità nasale profonda di pazienti PD con caratteristiche diverse dai soggetti sani (60).

Li et al. hanno eseguito analisi su campioni batterici presenti nella cavità nasale anteriore di 91 pazienti con PD e 91 controlli mediante sequenziamento della regione V4-V5 del gene 16S rRNA, che si sono concentrate sui generi più comuni (*Stenotrophomonas*, *u-Corynebacteriaceae* e *Staphylococci*). I dati ottenuti da questo studio hanno individuato alti valori di abbondanza relativa di *g unidentificata Corynebacteriaceae*, o *Corynebacteriales*, *f Corynebacteriaceae*, e *s Corynebacterium sp KPL1855* nel gruppo dei PD (61).

Le possibili variazioni nella composizione di specifiche famiglie/generi batterici nel microbiota nasale dei pazienti PD sono riassunte nella Tabella 2.

Come descritto precedentemente, l'alterazione dell'olfatto rappresenta un sintomo prodromico di PD. Per questo motivo la disbiosi che si osserva a livello delle cavità nasali può essere responsabile della perdita di olfatto che colpisce più dell'80% dei soggetti in fasi precliniche di malattia (62,63). Questa disbiosi può altresì promuovere la formazione di α -sin^D la quale, depositandosi nei neuroni della mucosa olfattiva, può contribuire al disturbo olfattivo ma anche iniziare il suo percorso di trasporto retrogrado che le consente di migrare nel bulbo olfattivo e infine nell'encefalo.

Tabella 2

Alterazione dei livelli di taxa (specificati per phylum, famiglia e genere) nel microbiota nasale di pazienti affetti da malattia di Parkinson

Phylum	Famiglia	Genere	Livello	Ref
Actinobacteria	Propionibacteriaceae	Propionibacterium humerusii	↓	(60)
		unidentified	↑	(61)
	Corynebacteriaceae			
			↑	(61)
	Nocardoidaceae	Marmoricola	↓	(58)
Proteobacteria	Moraxellaceae	Moraxella catarrhalis	↑	(60)
	Burkholderiaceae	Ralstonia insidiosa	↑	(60)
Firmicutes	Lachnospiraceae	Blautia wexlerae	↓	(60)
		Lachnospira pectinoschiza	↓	(60)

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Negli ultimi anni la ricerca sul microbiota ha fatto notevoli passi in avanti soprattutto grazie allo sviluppo di nuove tecnologie, tra cui il sequenziamento high-throughput (che consente di analizzare la composizione e le funzioni della flora batterica approfondendo aspetti che prima risultavano complessi e quasi impossibili da valutare), la metagenomica shotgun, la metatrascrittomica, la metabolomica, la metaproteomica e l'utilizzo di organoidi ingegnerizzati derivati da cellule staminali umane (64,65). Queste analisi hanno dimostrato che la perdita dell'eubiosi (soprattutto intestinale) può portare all'insorgenza di diverse patologie non solo a carico dell'apparato gastro-intestinale, ma anche a livello del SNC, ovvero disordini neurodegenerativi come la PD. Considerando infatti che molti sintomi non motori che precedono la comparsa clinica della PD coinvolgono l'intestino, dove è possibile rilevare depositi di α -sin^D, si è cercato di studiare se alterazioni dell'eubiosi intestinale potessero contribuire all'insorgenza e alla progressione della malattia. Dai molteplici studi pubblicati, sappiamo oggi che esistono correlazioni importanti tra alterazioni del microbiota intestinale e PD (32). Considerando poi che un altro segno prodromico di PD è la perdita dell'olfatto e che depositi di α -sin^D si localizzano nei neuroni della mucosa olfattiva di soggetti in fase preclinica di malattia, si è iniziato a studiare il possibile ruolo del microbiota nasale nell'insorgenza e progressione della malattia. Gli studi in questo settore sono ancora preliminari. Tuttavia, se consideriamo che l'agente causale di questa malattia è l' α -sin^D e che la sua formazione può dipendere da prodotti batterici (ad esempio proteine amiloidi tra cui curli o molecole come LPS) che si generano in seguito a disbiosi, non sorprenderebbe affatto che organi e tessuti

periferici che hanno collegamenti con il SNC in cui si genera α -sin^D fungano da siti di origine della malattia.

Campioni di mucosa olfattiva possono essere prelevati in modo molto semplice e non invasivo, e possono essere ripetuti nel tempo. Questi aspetti rendono la mucosa olfattiva un'ottima sorgente di materiale biologico per usi diagnostici e di ricerca, ancora poco sfruttata. Tuttavia, la disponibilità di test ultrasensibili (quali i "seed amplification assays"), capaci di identificare tracce di α -sin^D in questi campioni (anche in fasi precliniche), e la disponibilità di protocolli sempre più affidabili che consentono di analizzare in modo molto accurato il microbiota nasale, ci consentiranno di rivalutare la mucosa olfattiva in ambito diagnostico. In particolare, combinando i due approcci analitici (seed amplification assays e analisi molecolari/bioinformatiche del microbiota) sarà possibile stabilire se e in quale misura il microbiota nasale può effettivamente avere un ruolo cruciale nella formazione di α -sin^D. Oggi sappiamo che esistono diversi fenotipi clinici di PD e dati di letteratura suggeriscono che questi correlino con diverse conformazioni anomale di α -sin^D. Sarà quindi importante valutare se differenti alterazioni del microbiota siano in grado di influenzare le conformazioni anomale di α -sin^D, ponendo quindi le basi per spiegare l'eterogeneità fenotipica della malattia (Figura 1).

Se verrà confermato che la disbiosi nasale contribuisce all'insorgenza del PD, sarà possibile sviluppare approcci terapeutici innovativi e personalizzati volti a ristabilire l'eubiosi, riducendo i ceppi batterici dannosi (ad esempio tramite somministrazione di antibiotici selettivi) e introducendo ceppi batterici alternativi (come i probiotici). Potendo effettuare prelievi periodici di mucosa olfattiva si potranno monitorare i cambiamenti del microbiota in seguito a trattamento farmacologico, per valutarne l'efficacia. Infine, poiché esistono dei sintomi prodromici

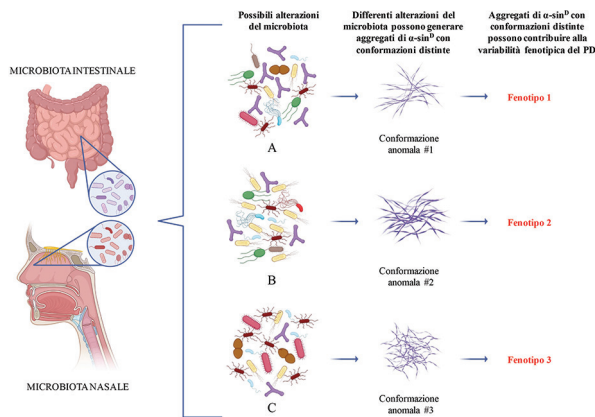


Figura 1
Ipotesi relativa al possibile contributo del microbiota intestinale e nasale nell'indurre un riarrangiamento strutturale della α -sin con generazione di aggregati proteici differenti potenzialmente responsabili dell'insorgenza della PD e della sua eterogeneità fenotipica. Created with BioRender.com.

di malattia, quali il disturbo del sonno, la costipazione e la perdita dell'olfatto, si potranno selezionare gruppi di pazienti da sottoporre a prelievo ed analisi di mucosa olfattiva. Questo consentirà di stabilire se e quanto prima rispetto alla comparsa dei sintomi classici associati alla PD compare disbiosi e se questa permetta di identificare in modo accurato i soggetti a maggior rischio di sviluppare PD. Diagnosticare precocemente la PD è la chiave per massimizzare l'efficacia dei trattamenti riducendo significativamente la progressione della malattia.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Laudadio I, Fulci V, Stronati L, et al. Next-Generation Metagenomics: Methodological Challenges and Opportunities. *OMICS* 2019;23:327-33.
2. Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:299-305.
3. Veneruso I, Tomaiuolo R, Cariati F, et al. Il microbiota umano: il buono, il brutto e il cattivo. *Biochim Clini* 2021;45:109-22.
4. Morgan XC, Segata N, Huttenhower C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet* 2013;29:51-8.
5. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174-80.
6. Valdes AM, Walter J, Segal E, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 2018;361:k2179.
7. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-20.
8. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the Healthy

Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 2019;7:14.

9. Iebba V, Totino V, Gagliardi A, et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol* 2016;39:1-12.
10. Thompson AL, Monteagudo-Mera A, Cadenas MB, et al. Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:3.
11. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:11971-5.
12. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 2012;150:470-80.
13. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001;48:198-205.
14. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 2009;9:123.
15. Greenhalgh K, Meyer KM, Aagaard KM, et al. The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environ Microbiol* 2016;18:2103-16.
16. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, et al. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res* 2013;69:52-60.
17. Alshehri D, Saadah O, Mosli M, et al. Dysbiosis of gut microbiota in inflammatory bowel disease: Current therapies and potential for microbiota-modulating therapeutic approaches. *Bosn J basic Med Sci* 2021;21:270-83.
18. Leonard MM, Valitutti F, Karathia H, et al. Microbiome signatures of progression toward celiac disease onset in at-risk children in a longitudinal prospective cohort study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021;118:e2020322118.
19. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *Bereswill S, editor. PLoS One* 2010;5:e9085.
20. D'Argenio V, Precone V, Casaburi G, et al. An altered gut microbiome profile in a child affected by Crohn's disease normalized after nutritional therapy. *Am J Gastroenterol* 2013;108:851-2.
21. Sudo N. Microbiome, HPA axis and production of endocrine hormones in the gut. *Adv Exp Med Biol* 2014;817:177-94.
22. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 2015;18:965-77.
23. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* 2014;6(263): 263ra158.
24. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res* 2018;1693:128-33.
25. Farzi A, Fröhlich EE, Holzer P. Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. *Neurotherapeutics* 2018; 15:5-22.
26. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 2017;19:29-41.
27. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:25.
28. Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, et al. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2017;58:1-15.
29. Pulikkan J, Mazumder A, Grace T. Role of the Gut

- Microbiome in Autism Spectrum Disorders. *Adv Exp Med Biol* 2019;1118:253-69.
30. Boziki MK, Kesidou E, Theotokis P, et al. Microbiome in Multiple Sclerosis: Where Are We, What We Know and Do Not Know. *Brain Sci* 2020;10:234.
 31. Boddy SL, Giovannelli I, Sassani M, et al. The gut microbiome: a key player in the complexity of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *BMC Med* 2021;19:13.
 32. Shen T, Yue Y, He T, et al. The Association Between the Gut Microbiota and Parkinson's Disease, a Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci* 2021;13:636545.
 33. Limbana T, Khan F, Eskander N. Gut Microbiome and Depression: How Microbes Affect the Way We Think. *Cureus* 2020;12:e9966.
 34. D'Argenio V, Sarnataro D. Microbiome Influence in the Pathogenesis of Prion and Alzheimer's Diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20:4704.
 35. Kalia L V, Lang AE. Around the world in a month. *Nat Biotechnol* 2015;33:896.
 36. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord* 2017;32:1264-310.
 37. Di Fonzo A, Monfrini E, Erro R. Genetics of movement disorders and the practicing clinician; who and what to test for? *Curr Neurol Neurosci Rep* 2018;18:37.
 38. Cazzaniga FA, De Luca CMG, Bistaffa E, et al. Cell-free amplification of prions: Where do we stand? *Prog Mol Biol Transl Sci* 2020;175:325-58.
 39. Bellomo G, Giulia De Luca CM, Paoletti FP, et al. Alpha synuclein seed amplification assays for diagnosing synucleinopathies: the way forward. *Neurology* 2022.
 40. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007;33:599-614.
 41. Grathwohl SA, Steiner JA, Britschgi M, et al. Mind the gut: secretion of α -synuclein by enteric neurons. *J Neurochem* 2013;125:487-90.
 42. Sánchez-Ferro Á, Rábano A, Catalán MJ, et al. In vivo gastric detection of α -synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015;30:517-24.
 43. Fayyad M, Salim S, Majbour N, Erskine D, et al. Parkinson's disease biomarkers based on α -synuclein. *J Neurochem* 2019;150:626-36.
 44. Braak H, Rüb U, Gai WP, et al. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* 2003;110:517-36.
 45. Musgrove RE, Helwig M, Bae E-J, et al. Oxidative stress in vagal neurons promotes parkinsonian pathology and intercellular α -synuclein transfer. *J Clin Invest* 2019;129:3738-53.
 46. Kim S, Kwon S-H, Kam T-I, et al. Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron* 2019;103:627-41.e7.
 47. Challis C, Hori A, Sampson TR, et al. Gut-seeded α -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice. *Nat Neurosci* 2020;23:327-36.
 48. Ghosh SS, Wang J, Yannic PJ, et al. Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *J Endocr Soc* 2020;4:bvz039.
 49. Kim C, Lv G, Lee JS, et al. Exposure to bacterial endotoxin generates a distinct strain of α -synuclein fibril. *Sci Rep* 2016;6:30891.
 50. Burokas A, Moloney RD, Dinan TG, et al. Microbiota regulation of the Mammalian gut-brain axis. *Adv Appl Microbiol* 2015;91:1-62.
 51. Sampson TR, Challis C, Jain N, et al. A gut bacterial amyloid promotes α -synuclein aggregation and motor impairment in mice. *Elife* 2020;9:e53111.
 52. Chen SG, Stribinskis V, Rane MJ, et al. Exposure to the functional bacterial amyloid protein curli enhances alpha-synuclein aggregation in aged fischer 344 rats and *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep* 2016;6:34477.
 53. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015;30:1351-60.
 54. Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 2015;30:350-8.
 55. Nishiwaki H, Ito M, Ishida T, et al. Meta-analysis of gut dysbiosis in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2020;35:1626-35.
 56. Jin M, Li J, Liu F, et al. Analysis of the gut microflora in patients with parkinson's disease. *Front Neurosci* 2019;13:1184.
 57. Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, et al. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Mov Disord* 2017;32:739-49.
 58. Pereira PAB, Aho VTE, Paulin L, et al. Oral and nasal microbiota in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2017;38:61-7.
 59. Heintz-Buschart A, Pandey U, Wicke T, et al. The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Mov Disord* 2018;33:88-98.
 60. Pal G, Ramirez V, Engen PA, et al. Deep nasal sinus cavity microbiota dysbiosis in Parkinson's disease. *Park Dis* 2021;7:111.
 61. Li Z, Lu G, Luo E, et al. Oral, nasal, and gut microbiota in parkinson's disease. *Neuroscience* 2022;480:65-78.
 62. Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2012;8:329-39.
 63. Bargar C, De Luca CMG, Devigili G, et al. Discrimination of MSA-P and MSA-C by RT-QuIC analysis of olfactory mucosa: the first assessment of assay reproducibility between two specialized laboratories. *Mol Neurodegener* 2021;16:82.
 64. Arnold JW, Roach J, Azcarate-Peril MA. Emerging Technologies for Gut Microbiome Research. *Trends Microbiol* 2016;24:887-901.
 65. Galloway-Peña J, Hanson B. Tools for Analysis of the Microbiome. *Dig Dis Sci* 2020;65:674-85.
 66. Li W, Wu X, Hu X, et al. Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Sci China Life Sci* 2017;60:1223-33.
 67. Li Z, Lu G, Li Z, et al. Altered Actinobacteria and Firmicutes Phylum Associated Epitopes in Patients With Parkinson's Disease. *Front Immunol* 2021;12:632482.
 68. Bedarf JR, Hildebrand F, Coelho LP, et al. Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients. *Genome Med* 2017;9:39.
 69. Maini Rekdal V, Bess EN, Bisanz JE, et al. Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism. *Science* 2019;364:eaau6323.
 70. Dodiya HB, Forsyth CB, Voigt RM, et al. Chronic stress-induced gut dysfunction exacerbates Parkinson's disease phenotype and pathology in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2020;135:104352.