

## **Steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e microbiota**

**L. Miele, A. Liguori, A. Gasbarrini, A. Grieco**

### **Introduzione**

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è la patologia cronica del fegato più diffusa. La NAFLD è caratterizzata dall'accumulo di grasso nel fegato e definita dalla presenza di steatosi in più del 5% degli epatociti all'esame istologico, in assenza di storia di consumo significativo di alcol o epatite virale. La NAFLD spesso si associa a patologie metaboliche quali obesità, diabete, ipertrigliceridemia, ipercolesterolemia e aterosclerosi; per tale motivo recentemente è stato proposto di ridefinire la NAFLD in MAFLD (Metabolic associated fatty liver disease).

Il termine NAFLD include differenti fenotipi clinico epatologici che vanno dalla steatosi alla steatoepatite con fibrosi. Il decorso della steatosi è generalmente benigno, tuttavia nei casi in cui si riscontrino infiammazione, degenerazione balloniforme e fibrosi sulla biopsia si definisce la steatoepatite alcolica (NASH) che, a differenza della steatosi semplice, può progredire verso forme più severe fino alla cirrosi ed all'epatocarcinoma (HCC).

La patogenesi della progressione del danno epatico risulta pertanto di interesse dal momento che influenza la differente espressione fenotipica clinica del danno.

Tra i principali fattori che costituiscono la patogenesi dell'evoluzione dalla NAFLD alla NASH vi è la disbiosi intestinale, ovvero l'alterazione del microbiota intestinale. Il microbiota intestinale è composto da batteri, virus e funghi. I batteri appartengono a specifici gruppi tassonomici, che comprendono phyla, classi, ordini, famiglie, generi e specie. Più del 90% del batterioma

intestinale appartiene a due phyla, Firmicutes e Bacteroidetes. La diversità microbica inizia nelle prime ore dopo la nascita e viene modellata durante l'infanzia e l'adolescenza quando la dieta diventa più diversificata e il sistema immunitario matura. Al contrario, nell'età adulta la composizione del microbiota nell'intestino rimane relativamente stabile ma viene condizionata da fattori ambientali come alterazioni nello stile di vita, farmaci e dieta.

### **Microbiota e patogenesi della NAFLD**

Studi su modelli animali hanno dimostrato un ruolo diretto per il microbiota intestinale nello sviluppo della NAFLD. Inoculazione di ceppi di *B. theta* e *M. smithii* nei topi adulti germ-free (GF) C57BL/6 ha aumentato l'adiposità dell'ospite indipendentemente dal quantitativo di cibo assunto con la dieta. Tali ceppi microbici promuovono l'assorbimento di monosaccaridi dal lume intestinale, che si traduce in un'induzione di lipogenesi. La maggior parte dei topi wild-type alimentati con dieta con alto contenuto di grassi (HFD-High Fat Diet) ha sviluppato resistenza all'insulina e infiammazione sistemica; tuttavia, alcuni topi sono rimasti sensibili all'insulina e hanno sviluppato livelli più bassi di infiammazione sistemica (non responder). I topi GF sono stati quindi inoculati con microbiota intestinale da responder e non responder e poi alimentati con HFD. È interessante notare che i topi che ricevevano il microbiota da un non responder sviluppavano meno steatosi e resistenza all'insulina rispetto ai topi che ricevevano il microbiota responder.

Su tale linea sono stati svolti anche studi traslazionali. In uno studio il microbiota intestinale raccolto da donatori obesi prima e

dopo la perdita di peso è stato trapiantato in topi GF, i topi che hanno ricevuto microbiota intestinale prima della perdita di peso avevano livelli più elevati di trigliceridi e colesterolo epatici rispetto ai topi che hanno ricevuto microbiota intestinale post-perdita di peso.

Diversi studi hanno infine analizzato la composizione del microbiota intestinale nei pazienti NAFLD rispetto ai soggetti di controllo. Nei pazienti con NAFLD è stato riscontrato un aumento dei proteobatteri a livello di phylum e più nel dettaglio un aumento delle Enterobacteriaceae, Escherichia e Dorea e una diminuzione delle Rikenellaceae, Ruminococcaceae, Anaerospiraceae, Coprococcus, Eubacterium, Faecalibacterium e Prevotella.

### ***Endotossina e permeabilità intestinale***

I pazienti affetti da NAFLD hanno una maggiore prevalenza di sovracrescita batterica del tenue. Il paziente affetto da NAFLD presenta un incremento della permeabilità intestinale e un incremento dei livelli circolanti di endotossina. La concentrazione di endotossina circolante è stata dimostrata essere ancor più elevata nel paziente con NASH. Tale incremento della permeabilità intestinale è talvolta correlato anche a una predisposizione genetica che determina una minor efficienza delle tight junctions enterocitarie. L'aumento dei livelli di endotossine circolanti innesca una risposta infiammatoria e fibrotica epatica. Oltre alle endotossine, anche altri metaboliti bioattivi intestinali, tra cui DNA batterico e peptidoglicani, possono contribuire alla progressione della NAFLD tramite pathway molecolari che coinvolgono rispettivamente TLR9 e NF-κB.

La disbiosi associata alla NASH e l'aumento della permeabilità intestinale causano il rilascio di PAMPs, metaboliti derivati dal microbioma intestinale, che rappresentano uno stimolo per l'infiammazione epatica e lipogenesi. A livello molecolare, infatti, le PAMPs attivano la

produzione di citochine e chemochine che incrementano l'infiltrazione delle cellule immunitarie nel fegato con conseguente incremento dello stress ossidativo anche a livello del DNA che contribuisce alla carcinogenesi dell'HCC.

### ***Metabolismo degli acidi biliari***

Gli acidi biliari sono sintetizzati nel fegato nelle loro specie primarie (acido colico e acido chenodeossicolico). Nell'intestino le specie primarie di acidi biliari sono deconiugate e deidrossilate dal microbiota intestinale a acidi biliari secondari più idrofobici, vale a dire l'acido deossicolico e litocolico, che vengono riassorbiti passivamente nell'ileo distale e restituiti al fegato attraverso la vena porta. Alcune specie batteriche nel colon, tra cui Clostridium ed Escherichia, possono intervenire nel metabolismo degli acidi biliari causando cambiamenti nella composizione degli acidi biliari circolanti. Diversi studi hanno rivelato che i pazienti affetti da NASH hanno livelli sierici più elevati di acidi biliari, compresi gli acidi biliari secondari, rispetto ai soggetti sani.

Gli acidi biliari hanno anche il ruolo di mediatori del segnale agendo su specifici recettori tra cui il Farnesoid Receptor X (FXR). FXR è altamente espresso nell'intestino e nel fegato e può essere attivato da acidi biliari primari liberi e coniugati. Nell'intestino tenue, l'attivazione FXR induce il fattore di crescita dei fibroblasti FGF19 nell'uomo o FGF15 nel topo, che si lega al recettore FGF4 (FGFR4) nel fegato per reprimere la sintesi degli acidi biliari stessi. L'attivazione dell'FXR epatico regola anche la lipogenesi de novo, la secrezione di VLDL e la gluconeogenesi nel fegato. Su tale meccanismo biologico sono stati sviluppati agonisti del recettore FXR nel trattamento della NASH.

Anche il metabolismo degli acidi biliari gioca un ruolo importante nello sviluppo di HCC su NASH. La disbiosi nella NASH, caratterizzata da una maggiore abbondanza di Gram-positivi, promuove l'HCC aumentando la produzione di acidi biliari secondari come

l'acido deossicolico, inibendo l'attivazione della cellula endoteliale sinusoidale epatica e portando alla soppressione del ligando della chemochina 6 (CXCL6) che determina un'inibizione del reclutamento di cellule T natural killer e un conseguente aumentato rischio di carcinogenesi. Inoltre, gli acidi biliari secondari contribuiscono direttamente allo sviluppo di HCC tramite il signaling di mTOR.

### **Acidi grassi a catena corta**

Gli acidi grassi a catena corta (SCFA) (acetato, propionato e butirrato) sono prodotti di fermentazione anaerobica generati dal microbiota intestinale da carboidrati non digeribili. Gli SCFA vengono trasferiti al fegato attraverso la circolazione portale e fungono da precursori per la lipogenesi o la gluconeogenesi epatica.

Studi preclinici dimostrano che gli SCFA attivano i recettori accoppiati con proteine G (GPCR) delle cellule L entero-endocrine intestinali. L'attivazione dei GPCR stimola il rilascio di peptide YY (PYY), che rallenta lo svuotamento gastrico e quindi migliora l'assorbimento dei nutrienti, e di GLP1, un ormone peptidico che inibisce lo svuotamento gastrico e l'assunzione di cibo. GLP-1 promuove anche la beta ossidazione lipidica epatica e riduce la steatosi epatica.

Oltre a funzionare come substrati metabolici che alimentano il metabolismo epatico del glucosio o dei lipidi, gli SCFA possono anche influenzare il metabolismo epatico fungendo da molecole di segnalazione. Propionato e butirrato attivano la proteinchinasi attivata da AMP (AMPK) per stimolare l'autofagia epatica, un processo catabolico che facilita l'idrolisi dei trigliceridi e rilascia acidi grassi liberi per la  $\beta$ -ossidazione mitocondriale.

Studi clinici hanno valutato i livelli di SCFA nel sangue e nei campioni fecali di pazienti con NAFLD. È stato evidenziato che i pazienti con fibrosi avanzata avevano un aumento dei livelli di acetato fecale, mentre i pazienti con fibrosi lieve o moderata avevano un aumento dei livelli di butirrato e propionato.

L'integrazione degli SCFA nei modelli preclinici della NAFLD ha dimostrato effetti benefici sulla NAFLD. Nei topi alimentati con HFD, l'integrazione del butirrato ha diminuito l'infiammazione nel fegato e nel tessuto adiposo. Inoltre, il butirrato ha anche modificato la popolazione batterica del microbiota intestinale aumentando i batteri produttori di SCFA e diminuendo i batteri che secernono endotossine.

### **Etanolo**

Basse quantità di etanolo endogeno possono essere generate dal microbiota intestinale contribuendo allo sviluppo della NASH. Questa ipotesi è supportata da prove sperimentali che mostrano che i topi ob/ob che hanno sviluppato NAFLD avevano un contenuto alcolico più elevato nel respiro mattutino rispetto ai loro corrispettivi magri e, inoltre, tale effetto è annullato dal trattamento antibiotico. La produzione intestinale di etanolo può essere dovuta alla disbiosi. Enterobacteriaceae e alcune specie come *Escherichia coli* risultano aumentate nel microbiota dei pazienti con NASH ed è stato dimostrato che possono produrre quantità significative di etanolo soprattutto in condizioni di anaerobiosi. Oltre agli effetti potenzialmente tossici sul fegato, l'etanolo prodotto dai batteri può aumentare la permeabilità intestinale e i livelli di LPS portale che attivano la cascata infiammatoria e contribuiscono al danno epatico.

### **Modulazione del microbiota, ruolo terapeutico nella NASH**

L'attuale trattamento raccomandato per i pazienti NAFLD è la modifica dello stile di vita, che include, esercizio fisico, dieta e perdita di peso per correggere i fattori di rischio sottostanti come obesità e diabete. Di recente sono emerse prove che suggeriscono un potenziale ruolo dell'intervento sul microbiota intestinale nel trattamento dei pazienti con NAFLD e NASH. Gli approcci che sono stati esplorati nella modulazione del microbiota sono molteplici:

*Antibiotici.* In modelli animali di NAFLD la somministrazione di antibiotici quali bacitracina, neomicina e streptomina ha determinato un miglioramento dei parametri istologici della NAFLD. Ulteriori evidenze hanno mostrato che il trattamento con rifaximina è in grado di ridurre significativamente le citochine proinfiammatorie, l'ALT e il grado istologico di steatosi nella NAFLD. Nonostante questi potenziali effetti benefici, gli antibiotici devono essere usati con giudizio e potrebbero non essere una terapia appropriata per la maggior parte dei pazienti poiché alterano la normale flora batterica e aumentano il rischio di crescita di batteri patogeni come il *Clostridium difficile*.

*Prebiotici, probiotici e sinbiotici.* I prebiotici sono prodotti alimentari indigeribili che non contengono organismi viventi ma sono in grado di promuovere la crescita e il metabolismo dei batteri. I probiotici sono definiti come batteri vitali che, al momento dell'ingestione, aiutano a migliorare l'integrità della mucosa intestinale modulando il microbiota intestinale. L'uso combinato di approcci pre e probiotici è chiamato terapia sinbiotica. I prebiotici potrebbero essere i candidati ideali per il trattamento della NAFLD grazie al loro basso costo e profilo di sicurezza; tuttavia, la loro efficacia rimane incerta. In modelli preclinici l'utilizzo del *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) ha determinato un aumento di FGF21 e di FGF21 circolanti, nonché l'aumento dell'espressione PPAR $\alpha$  epatica e della concentrazione di butirato fecale.

Una recente metanalisi di pazienti NAFLD ha dimostrato che l'uso di prebiotici ha determinato una modesta riduzione di ALT e AST ma nessun cambiamento nei marcatori infiammatori sierici e nel colesterolo totale. I sinbiotici sono stati utilizzati per trattare la NAFLD negli studi sugli animali e nei pazienti adulti. Nel modello preclinico i roditori con HFD che assumevano sinbiotici avevano un miglioramento dell'infiammazione e una diminuzione delle quantità di

Enterobatteriacee ed *Escherichia coli* nella mucosa colica. Studi su pazienti NASH hanno dimostrato che l'uso di sinbiotici per 24 settimane determina una significativa riduzione dei livelli di TNF- $\alpha$  e proteina C reattiva. In uno studio controllato con placebo (N = 80), i pazienti NAFLD che hanno ricevuto sinbiotici per otto settimane hanno avuto riduzioni significative del grado di steatosi mentre i pazienti che hanno ricevuto placebo non hanno mostrato alcun miglioramento. Tuttavia, non sono state osservate differenze significative nei livelli di ALT e AST tra i due gruppi.

È bene notare che gli effetti benefici dei pre-, pro- e sinbiotici possono variare tra gli individui, a causa delle differenze nelle abitudini alimentari, nella microflora intestinale e nel background genetico dell'ospite. Tuttavia, è possibile che l'individualizzazione dei trattamenti in base alla composizione del microbiota intestinale possa in futuro migliorare l'efficacia di tale terapia.

### ***Trapianto di microbiota (FMT: fecal microbiota transplant)***

Il trapianto di microbiota fecale è un nuovo approccio terapeutico volto a ripopolare il microbiota intestinale di pazienti con flora intestinale sana. L'FMT è stato utilizzato con successo nel trattamento della colite da *Clostridium difficile* refrattaria e ricorrente e attualmente è in corso di sperimentazione nel trattamento di altre patologie caratterizzate da disbiosi, quali anche la NAFLD/NASH. In modelli animali l'FMT ha attenuato la NASH indotta da HFD nei topi migliorando l'accumulo di lipidi intraepatici, l'insulino resistenza e i livelli di citochine proinfiammatorie. Un altro studio ha dimostrato che gli animali con NAFLD che sono stati sottoposti a trapianto fecale andavano incontro ad una riduzione della gluconeogenesi epatica e della permeabilità intestinale. In trial clinici i pazienti con sindrome metabolica che hanno ricevuto microbiota intestinale da individui sani

andavano incontro ad un miglioramento della sensibilità all'insulina e ad un ampliamento della varietà microbica intestinale. Finora questi primi studi suggeriscono che l'FMT potrebbe avere effetti positivi sulla NAFLD/NASH, ma tali risultati andranno confermati in ulteriori studi ancora in corso.

### **Conclusioni**

Lo sviluppo e la progressione della NAFLD è un processo complesso e multifattoriale che dipende da fattori genetici e ambientali.

Le evidenze precliniche e cliniche suggeriscono che la disbiosi intestinale contribuisce alla progressione della NAFLD/NASH e al rischio di sviluppare HCC. Il monitoraggio sierico e fecale di diversi metaboliti batterici come biomarcatori non invasivi di disbiosi intestinale potrebbe rappresentare in un prossimo futuro un utile strumento diagnostico e prognostico nella gestione del paziente con NAFLD e NASH. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari nella NAFLD per una migliore caratterizzazione del microbiota intestinale e successivamente per lo sviluppo di prebiotici e probiotici specifici.

### **BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE**

Ji Y, Yin Y, Li Z, Zhang W. Gut Microbiota-Derived Components and Metabolites in the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients* 2019; 11: 1712.

Miele L, Giorgio V, Liguori A, et al. Genetic susceptibility of increased intestinal permeability is associated with progressive liver disease and diabetes in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2020; 30: 2103-10.

Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 1877-87.

Mouries J, Brescia P, Silvestri A, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol* 2019; 71: 1216-28.

Nicoletti A, Ponziani FR, Biolato M, et al. Intestinal permeability in the pathogenesis of liver damage: From non-alcoholic fatty liver disease to liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2019; 25: 4814-34.

Dott. Luca Miele, Prof. Antonio Liguori, Prof. Antonio Gasbarrini, Prof. Antonio Grieco, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Traslazionali, Università Cattolica del S. Cuore, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma

Per la corrispondenza:  
luca.miele@policlinicogemelli.it;  
luca.miele@unicatt.it