

# Oligosaccaridi del latte materno e microbiota gastrointestinale

*C'è un razionale per il loro utilizzo nei casi di autismo?*

Clifford A. Adams<sup>1</sup>, Bettina Gutiérrez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Anozene Nutritional Sciences, Anversa, Belgio

<sup>2</sup>Jennewein, Rheinbreitbach, Germania

Bettina.Gutierrez@jennewein-biotech.de

Parole chiave: Microbiota, Asse intestino-cervello, Oligosaccaridi del latte umano, Autismo

## SUMMARY

### *Human milk oligosaccharides and gi microbiota*

#### *Is there a rationale for the use of HMOs in AUTISM?*

*The gastrointestinal (GI) microbiota plays a key role in health and disease. It also has a long-distance effect influencing the brain through the gut-brain-axis. The establishment of an effective GI microbiota is associated with human milk oligosaccharides (HMOs). In animal studies there is evidence that HMOs can influence brain activity and cognitive development. This further suggests that management of the GI microbiota by dietary means could impact upon a wide range of diseases. Autism which is the familiar name for Autism spectrum disorder (ASD) comprises a group of heterogeneous neurodevelopmental disorders characterized by social deficits, repetitive and stereotypical behaviours, insistence on routines and communication impairments. Gastrointestinal abnormalities are characteristic of a substantial number of children with ASD. They possess lower overall abundance of beneficial taxa, such as Bifidobacterium and Akkermansia in the GI microbiota. Many children with ASD have higher counts of potentially pathogenic Clostridia than normally developing children. The underlying pathophysiology of ASD remains unknown although sub-optimal breast-feeding practices are associated with ASD. Human milk oligosaccharides selectively promote the growth of Bifidobacteria in the GI tract which is associated with numerous beneficial health outcomes. There are two potential benefits of HMOs in alleviating autism. Firstly, supplying HMOs to infants through breast-feeding can help establish a functional GI microbiota and thus avoid GI dysbiosis which is commonly related to the onset of autism. Secondly, administration of HMOs may alleviate the symptoms of autism through an effect on the gut-brain-axis.*

## Riassunto

Il microbiota gastrointestinale (GI) svolge un ruolo fondamentale per la salute e le malattie; svolge anche un effetto di modulazione dell'attività cerebrale attraverso l'asse intestino-cervello. Lo sviluppo di un efficace microbiota GI è associato agli oligosaccaridi del latte umano (HMO). Studi eseguiti sugli animali hanno dimostrato che gli HMO possono influenzare l'attività cerebrale e lo sviluppo cognitivo, indicando inoltre che la gestione del microbiota gastrointestinale tramite l'alimentazione potrebbe avere ripercussioni su una vasta gamma di malattie. L'autismo, che è il nome comune del disturbo dello spettro autistico (ASD), comprende un gruppo di disfunzioni neuro-evolutive eterogenee caratterizzate da deficit sociali, comportamenti ripetitivi e stereotipati, insistenza sulle routine e problemi della comunicazione. Le anomalie gastrointestinali sono caratteristiche

di un numero notevole di bambini affetti da ASD, i quali possiedono nel microbiota GI una quantità complessiva inferiore di taxa benefici, come il *Bifidobacterium* e l'*Akkermansia*, e un numero maggiore di *Clostridia* potenzialmente patogeni rispetto ai bambini con un quadro evolutivo nella norma. La fisiopatologia soggiacente all'ASD rimane sconosciuta, sebbene le pratiche di allattamento al seno non ottimali siano associate a questo disturbo. Gli oligosaccaridi del latte umano promuovono in modo selettivo la crescita di bifidobatteri nel tratto gastrointestinale, cui si associano numerosi effetti benefici per la salute. Gli HMO vantano, in particolare, due potenziali effetti benefici nel mitigare l'autismo. Innanzitutto, l'apporto di HMO ai neonati tramite l'allattamento al seno può aiutare a stabilizzare un microbiota GI funzionale, evitando quindi la disbiosi gastrointestinale che è comunemente correlata all'insorgenza dell'autismo. In secondo luogo, la somministrazione di HMO

può alleviare i sintomi dell'autismo attraverso l'effetto sull'asse intestino-cervello.

## Introduzione

Il microbiota gastrointestinale (GI) svolge un ruolo fondamentale per la salute e le malattie: contribuisce alla digestione dei componenti alimentari non digeribili nel tratto gastrointestinale superiore ed è strettamente coinvolto in vari aspetti della normale fisiologia dell'ospite come la protezione contro i patogeni, la modulazione del sistema immunitario e dello sviluppo gastrointestinale. Inoltre, il microbiota GI svolge un ruolo fondamentale in diverse malattie o ne è la causa. La composizione del microbiota GI è principalmente influenzata da fattori genetici, età e dieta (1).

Numerose malattie negli adulti e nei neonati sono collegabili al microbiota GI, tra cui il cancro allo stomaco, il linfoma del tessuto linfoide associato alla mucosa, le malattie croniche infiammatorie intestinali, l'obesità, l'enterocolite necrotizzante e il disturbo dello spettro autistico (ASD).

Il microbiota GI non solo influenza gli eventi nel tratto gastrointestinale, ma ha anche un effetto remoto sulla funzione cerebrale. L'abilità del cervello di regolare la funzione del tratto gastrointestinale è nota da tempo, tuttavia la natura bidirezionale di questa relazione è stata chiarita solo nell'ultimo decennio.

Sulla base di studi condotti su roditori allevati in un ambiente privo di germi, il microbiota GI sembra influenzare lo sviluppo del comportamento emotivo, i sistemi di modulazione dello stress e del dolore, e i sistemi di neurotrasmissione cerebrale (2). Un disturbo del microbiota nei ratti maschi genera cambiamenti a lungo termine nella percezione del dolore viscerale (3). Il microbiota GI influisce sulla funzione del sistema nervoso centrale attraverso i sistemi metabolico, neuroendocrino e immunitario, e incide sullo sviluppo cognitivo (4,5).

## Oligosaccaridi del latte umano e asse intestino-cervello

Gli oligosaccaridi del latte umano sono associati allo sviluppo funzionale nella prima infanzia, principalmente in relazione all'immunità e alla salute gastrointestinale attraverso la costituzione di un microbiota GI efficace. Studi eseguiti su animali hanno dimostrato che gli HMO possono influenzare l'attività cerebrale e lo sviluppo co-

gnitivo. A seguito di somministrazione orale prolungata dell'HMO, 2'-fucosillattosio (2'-FL) nei ratti e nei topi, questi hanno mostrato risultati migliori in vari tipi di test comportamentali di apprendimento. Inoltre, la somministrazione prolungata di 2'-FL ha aumentato l'espressione di diverse molecole coinvolte nella memorizzazione di ricordi di nuova acquisizione, come la proteina di densità postsinaptica 95, la chinasi calcio-calmodulina dipendente di tipo II fosforilata e il fattore neurotrofico cerebrale in strutture corticali e subcorticali. Da un punto di vista complessivo, i dati mostrano che il 2'-FL alimentare influisce sugli ambiti cognitivi migliorando l'apprendimento e la memoria nei roditori (6).

Attualmente, un crescente numero di evidenze indica la presenza di un effetto diretto degli HMO sull'asse intestino-cervello per lo sviluppo appropriato di molte funzioni del sistema nervoso centrale come la motilità gastrointestinale. Diversi HMO hanno un pronunciato effetto sulle contrazioni motorie gastrointestinali, come indicato da un modello di peristalsi del colon nel topo (7). Le molecole fucosilate 2'-fucosillattosio (2'-FL) e 3'-fucosillattosio (3'-FL) hanno ridotto la contrattilità intestinale in modo dipendente dalla concentrazione. Su una base di concentrazione relativa, 2'-FL è circa tre volte più attivo di L-fucosio e 3'-FL è più di due volte efficace rispetto a 2'-FL. Gli HMO fucosilati hanno avuto l'effetto immediato di ridurre la contrattilità del muscolo liscio del colon entro 5-15 minuti. È improbabile che questi effetti degli HMO avvengano mediante stimolazione dei bifidobatteri, ma piuttosto i risultati indicano un'interazione specifica degli HMO fucosilati con i recettori dei tessuti, che a loro volta regolano la motilità gastrointestinale attivando i neuroni enterici.

Il nervo vago sembra rappresentare, nello specifico, una via basilare per la trasmissione dell'effetto degli HMO nella comunicazione intestino-cervello. La stimolazione del nervo vago rafforza il potenziamento e l'apprendimento a lungo termine dell'ippocampo in ratti liberi di muoversi (8). La recisione del nervo vago nei ratti ha inibito gli effetti benefici di 2'-FL sull'apprendimento e il potenziamento a lungo termine dell'ippocampo (9). Evidentemente il nervo vago svolge un ruolo importante come mediatore dell'asse intestino-cervello.

Questi studi non evidenziano le modalità con cui gli HMO influenzano lo sviluppo cognitivo: potrebbero avere un impatto diretto sull'asse intestino-cervello o forse i metaboliti derivanti dalla digestione degli HMO da parte del microbiota GI potrebbero influire sul siste-

ma nervoso enterico, che a sua volta esercita il proprio influsso sul nervo vago che invia segnali direttamente al cervello.

Il microbiota GI umano ha molteplici ripercussioni sulla salute del cervello umano. L'eccessiva stimolazione dovuta a disbiosi batterica, crescita batterica eccessiva nell'intestino tenue o maggiore permeabilità intestinale possono generare infiammazione sistemica e/o del sistema nervoso centrale. Le proteine batteriche possono avere una reazione crociata con antigeni umani per stimolare le risposte disfunzionali del sistema immunitario adattativo. Gli enzimi batterici possono produrre metaboliti neurotossici come acido D-lattico e ammoniaca. Anche i metaboliti benefici come gli acidi grassi a catena corta, in particolare l'acido propionico, possono sviluppare neurotossicità.

Il microbiota GI è in grado di produrre ormoni e neurotrasmettitori identici a quelli prodotti dall'uomo. I recettori batterici di questi ormoni influiscono sulla crescita microbica e sulla virulenza (10).

Lo sviluppo del concetto dell'asse intestino-cervello indica, inoltre, che la gestione del microbiota GI con l'alimentazione può migliorare il benessere fisico e psichico dell'uomo, oltre a proporre interventi alimentari per diverse patologie come la sindrome dell'intestino irritabile, l'ansia, la depressione, il morbo di Alzheimer e l'ASD (11).

## Microbiota GI e autismo

L'autismo è il nome più comune del disturbo dello spettro autistico (ASD) che comprende un gruppo di disfunzioni neuro-evolutive eterogenee caratterizzate da deficit sociali, comportamenti ripetitivi e stereotipati, insistenza sulle routine e problemi della comunicazione. Tale patologia comprende l'autismo, la sindrome di Asperger e il disturbo generalizzato dello sviluppo non altrimenti specificato (PDD-NOS). Dagli studi epidemiologici emerge che l'incidenza dell'ASD è in crescita (12). Inoltre, il numero di casi diagnosticati di disturbo dello spettro autistico sta aumentando a un ritmo allarmante, tanto che il *Center for Disease Control* stima il tasso di incidenza nel 2014 di 1 su 68. Di recente è stata avanzata l'ipotesi secondo cui i batteri gastrointestinali possano contribuire allo sviluppo dell'autismo (13,14).

Le anomalie gastrointestinali, infatti, sono caratteristiche di un numero notevole di bambini interessati da ASD (13). Si stima che il 50% o più di questi bambini sia affetto da una prevalenza dei sintomi quattro volte maggiore rispetto ai bambini che non presentano ASD. Alcuni dei sintomi riportati più comunemente sono la costipazione cronica, diarrea, gonfiore e reflusso gastro-

esofageo, e dolore addominale. Inoltre, numerosi studi svolti su bambini affetti da ASD hanno evidenziato la presenza di disbiosi microbica gastrointestinale; uno squilibrio nei microrganismi che compongono il microbiota gastrointestinale (14).

Le osservazioni secondo cui la percezione del dolore e l'ASD siano collegati al microbiota GI costituiscono un ulteriore supporto al concetto dell'asse intestino-cervello. Tale concetto attribuisce al microbiota GI funzioni di modulazione della plasticità cerebrale e l'influsso sullo sviluppo precoce dei normali comportamenti sociali e cognitivi come l'apprendimento e la memoria, che influenzeranno successivamente l'umore e il comportamento (15-17).

Gran parte degli studi dimostra che i bambini affetti da ASD presentano una maggiore diversità batterica nel loro microbiota GI e possiedono una quantità complessiva inferiore di taxa potenzialmente benefici, come *Bifidobacterium* e *Akkermansia*. Molti, ma non tutti, bambini affetti da ASD presentano un numero maggiore di *Clostridia* potenzialmente patogeni rispetto ai bambini con un quadro evolutivo nella norma. La specie di *Clostridia* sintetizza numerosi prodotti metabolici come fenoli, p-cresolo e derivati dell'indolo potenzialmente tossici per l'uomo. Inoltre, è stato osservato un rapporto anomalo tra firmicuti e batteroidi, e un aumento dei livelli di alcuni taxa dannosi come i proteobatteri (14). Sembra che i relativi equilibri tra i microrganismi infiammatori, come *Clostridia* e *Desulfovibrio*, e i bifidobatteri possano destabilizzarsi prima dello sviluppo dell'autismo. Lo squilibrio genera un tratto gastrointestinale soggetto a perdite, caratterizzato da una membrana epiteliale più porosa con conseguente rilascio di tossina microbica nel sangue, che può contribuire all'infiammazione del cervello e allo sviluppo dell'autismo (18).

## Disturbo dello spettro autistico e nutrizione infantile

La patofisiologia sottostante all'ASD rimane ancora sconosciuta, nonostante sia stata dimostrata l'associazione tra le pratiche di allattamento al seno non ottimali, tra cui la mancata assunzione di colostro, la breve durata dell'allattamento al seno e la manifestazione dell'ASD (19). Questa associazione segue un modello dose-risposta, con il rischio di ASD in calo in presenza di periodi più prolungati di allattamento, ovvero esclusivo per i primi sei mesi e protratto per i primi due anni di vita. Inoltre, nei bambini affetti da ASD l'allattamento al seno risulta essere meno frequente e, quando presente, ha una durata molto più breve.

Sono molti i fattori che contribuiscono all'allattamen-

to al seno non ottimale nei bambini con ASD. È anche possibile che le madri dei bambini affetti da ASD interrompano o non inizino l'allattamento a causa di problemi temperamentali o comportamentali associati alla patologia che possono rendere l'allattamento al seno più difficile (19).

Agli oligosaccaridi del latte umano (HMO), il terzo componente più abbondante del latte materno, è stata riconosciuta la funzione di promotori selettivi della crescita dei bifidobatteri nel tratto gastrointestinale, nonostante forniscano al bambino un supporto nutrizionale diretto limitato. Il componente del microbiota GI, il *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (*B. infantis*), è considerato benefico per la salute gastrointestinale; si è scoperto che domina il microbiota GI di neonati sani allattati al seno ed è associato a numerosi esiti benefici per la salute. Studi *in vitro* hanno dimostrato la sua capacità di migliorare l'integrità della barriera gastrointestinale e di ridurre l'espressione dei geni infiammatori nelle cellule epiteliali intestinali. Il *B. infantis* cresce particolarmente bene in presenza di HMO, con l'esclusione di altri batteri potenzialmente dannosi (19).

## Esiste un razionale per l'uso degli HMO nei casi di autismo?

Gli attuali trattamenti per l'ASD comprendono la terapia comportamentale, la logopedia, la terapia sociale e l'approccio nutrizionale, ma nessun trattamento medico è stato approvato per gestire i sintomi chiave dell'ASD, come la difficoltà di comunicazione sociale e i comportamenti ripetitivi.

La teoria secondo cui l'insorgenza dell'ASD sia correlata ai cambiamenti nel microbiota GI, in particolare a un numero ridotto di bifidobatteri e ad un aumento di *Clostridium* spp., *Desulfovibrio* spp., *Sutterella* spp., e presumibilmente *Veillonellaceae* (20), ha ottenuto un notevole consenso. Tenendo conto del collegamento tra il cervello e il microbiota GI, la modulazione di quest'ultimo da parte degli HMO può offrire per l'ASD potenziali opzioni terapeutiche o una strategia preventiva della malattia.

Il latte umano può quindi avere il ruolo primario nel modulare un microbiota GI appropriato attraverso gli HMO. Gli oligosaccaridi del latte umano, unici nel loro genere, non possono essere digeriti dal bambino, ma vengono utilizzati dai batteri nel microbiota GI favorendo l'espressione di un microbiota GI benefico. Si tratta di un potenziale meccanismo grazie al quale il latte umano potrebbe fornire effetti benefici a lungo termine sulla salute dei bambini anche dopo lo svezzamento (21).

Gli oligosaccaridi del latte umano offrono due potenziali benefici nell'alleviare i sintomi dell'ASD. Innanzitutto, l'apporto di HMO ai neonati tramite l'allattamento al seno può aiutare a stabilire un microbiota GI funzionale, evitando quindi la disbiosi gastrointestinale che è comunemente correlata all'insorgenza dell'autismo. In secondo luogo, le prove presentate da studi sugli animali indicano che gli HMO esercitano un influsso sulle funzioni cognitive migliorando l'apprendimento e la memoria. È quindi possibile che la somministrazione di HMO a pazienti affetti da ASD possa contribuire ad alleviare alcuni dei sintomi mediante un effetto sull'asse intestino-cervello.

Inoltre, è stato dimostrato che la somministrazione di HMO ad adulti sani, a dosi giornaliere fino a 20 g, è perfettamente sicura e ben tollerata (22). In un altro studio, 100 soggetti adulti sono stati randomizzati in 10 gruppi, ciascuno dei quali ha consumato HMO prodotti chimicamente a varie dosi giornaliere (5, 10 o 20 g) o 2 g di glucosio come placebo per 2 settimane (23). Lo studio ha verificato la sicurezza, la tollerabilità e gli eventi avversi degli HMO: la tollerabilità si è dimostrata buona, mentre gli eventi avversi lievi. Questi risultati di sicurezza suggeriscono che uno studio sugli effetti degli HMO in individui affetti da ASD potrebbe essere fattibile.

## Bibliografia

1. Alou MT, Lagier J-C, Raoult D (2016) Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. *Human Microbiome J* 1:3-11
2. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A (2015) Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest* 125:926-938
3. O'Mahony SM, Felice VD, Nally K et al (2014) Disturbance of the gut microbiota in early-life selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats. *Neuroscience* 277:885-901
4. Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Rev Neurosci* 13:701-712
5. Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK et al (2014) Gut microbes and the brain: Paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci* 34:15490-15496
6. Vázquez E, Barranco A, Ramírez M et al (2015) Effects of a human milk oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, on hippocampal long-term potentiation and learning capabilities in rodents. *J Nutritional Biochem* 26:455-465
7. Bienenstock J, Buck RH, Linke H et al (2013) Fucosylated but not sialylated milk oligosaccharides diminish colon motor contractions. *PLoS ONE* 8:e76236. doi.org/10.1371/journal.pone.007623

8. Zuo Y, Smith DC, Jensen RA (2007) Vagus nerve stimulation potentiates hippocampal LTP in freely-moving rats. *Physiol Behav* 90:583-589
9. Vázquez E, Barranco A, Ramirez M et al (2016) Dietary 2'-fucosyllactose enhances operant conditioning and long-term potentiation via gut brain communication through the vagus nerve in rodents. *PLoS ONE* 11:e0166070
10. Galland L (2014) The gut microbiome and the brain. *J Med Food* 17:1261-1272
11. Lawrence K, Hyde J (2017) Microbiome restoration diet improves digestion, cognition and physical and emotional wellbeing. *PLoS One*, 12:e0179017.
12. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L et al (2013) Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One* 8:e76993
13. Adams JB, Johansen LJ, Powell LD et al (2011) Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterology* 11:22, <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/11/22>
14. Sanctuary MR, Kain JN, Chen SY et al (2019) Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *PLoS One* 14:e0210064
15. Cryan JF, O'Mahony SM (2011) The microbiome-gut-brain axis: From bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motility* 23:187-192
16. Foster, JA, McVey Neufeld KA (2013) Gut–brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* 36:305-312
17. Leung K, Thuret S (2015) Gut microbiota: a modulator of brain plasticity and cognitive function in ageing. *Healthcare* 3:898-916
18. Weston B, Foga B, Cook D et al (2015) An agent-based modeling framework for evaluating hypotheses on risks for developing autism: Effects of the gut microbial environment. *Med Hypotheses* 84:395-401
19. Mulle, JG, Sharp WG, Cubells JF (2013) The gut microbiome: a new frontier in autism research. *Curr Psychiatry Rep* 5:337
20. Grimaldi R, Gibson, GR, Vulevic J et al (2018) A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome* 6:133
21. Newburg DS, Morelli L (2015) Human milk and infant intestinal mucosal glycans guide succession of the neonatal intestinal microbiota. *Pediatric Res* 77:115-120
22. Elison E, Vigsnaes LK, Krogsgaard LR et al (2016) Oral supplementation of healthy adults with 2'-O-fucosyllactose and lactoN-neotetraose is well tolerated and shifts the intestinal microbiota. *Br J Nutr* 116:1356-1368
23. Salomonsson E, Vigsnaes L, Sommer M et al (2016) Human milk oligosaccharides; now as substantial modulators of the adult gut microbiota. Paper presented at the International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics, Budapest, IPC2016 Proceedings, p. 114