

Il microbiota cutaneo e le sue interazioni con l'ospite

Paola Pini

Ambulatorio Ulcere Cutanee Ospedale di Gazzaniga, ASST Bg EST, Gazzaniga, Bergamo, Italia

RIASSUNTO

Se gli anni '60 dello scorso secolo sono stati la pietra miliare nell'ambito del *wound healing* con la dimostrazione che la guarigione delle lesioni avviene in ambiente umido, l'inizio del 21° secolo è stato testimone di un notevole incremento di pubblicazioni, studi, ricerche sul rapporto microbiota-cute, microbiota-ulcera cutanea e microbiota-*wound healing*. Il microbiota cutaneo, ovvero l'insieme di microrganismi che colonizza la pelle dell'ospite, è intimamente correlato con la salute e la malattia cutanea. Il dialogo costante e specifico tra la flora commensale e le cellule cutanee, entrambe dotate di elevata competenza immunologica e che regola l'omeostasi cutanea e promuove il ripristino della barriera danneggiata, è completamente sregolato nelle ferite croniche. Come noto la guarigione delle ulcere è un processo complesso e molto organizzato, strettamente controllato dai diversi tipi di cellule della pelle attraverso la secrezione di fattori di crescita, citochine e chemochine. L'interruzione di questo processo impedisce il corretto ripristino della barriera cutanea e di conseguenza la ferita non guarisce e si cronicizza. Le ferite offrono l'opportunità alla flora residente e a quella ambientale di entrare nei tessuti sottostanti e trovare le condizioni ottimali per la loro colonizzazione e la loro crescita. Durante il normale processo di *wound healing* l'interazione dei microrganismi commensali con le cellule cutanee partecipa attivamente alla modulazione della risposta immunitaria innata; al contrario si sospetta che i microrganismi patogeni svolgano un ruolo sostanziale nel ritardare la guarigione delle ferite. In questa review verranno sinteticamente descritte le caratteristiche della cute come organo immunitario, le sue interazioni con la flora commensale, opportunistica e patogena, sia in condizione di omeostasi che in presenza di lesioni cutanee e, infine, accennate ipotesi terapeutiche future straordinariamente interessanti.

ABSTRACT

While the 1960s have been a milestone regarding wound healing, by proving that wounds can be cured in a humid environment, the beginning of the 21st century has seen a considerable increase of publications and studies about the relationship microbiota-skin, microbiota-cutaneous ulcer and microbiota-wound healing. The skin microbiota is a collection of microorganisms that colonizes the host's skin, and it is intimately linked to skin health and skin diseases. The specific and constant communication between commensal flora and skin cells, both with a substantial immunological competence regulating the epidermal homeostasis and promoting renewal of the damaged tissue, is completely out of balance in chronic wounds. It is known that ulcer healing is a complex and very organized process, strictly controlled by different skin cell types through secretion of growth functions such as cytokine and chemokine. If this process is interrupted, it prevents a correct renewal of the skin tissue, thus the wound cannot heal and becomes chronic. Wounds allow the resident and the exogenous flora to enter the tissues underneath and find optimal conditions for them to colonize and grow. During the regular wound healing process, the interaction of commensal microorganisms with skin cells actively takes part in modulating the innate immune response; on the other hand pathogens are thought to play an important part in delay wound healing. This review briefly describes the skin as an immune organ, its interactions with the commensal, opportunistic and pathogenic flora, both in homeostasis and with skin wounds. Very interesting future therapeutical hypotheses are also shortly presented.

Corrispondenza: Paola Pini, Ambulatorio Ulcere Cutanee Ospedale di Gazzaniga, ASST Bg EST, Via Manzoni 130, 24025 Gazzaniga, Bergamo, Italia.
E-mail: paolapini.mmg@libero.it

Parole chiave: Cute e funzione immune; microbiota cutaneo; microbiota cutaneo e interazioni con l'ospite; microbiota e *wound healing*.

Conflitto di interessi: L'autore dichiara l'assenza di conflitto di interessi.

Disponibilità di dati e materiali: I dati analizzati in questo articolo sono disponibili su richiesta.

Approvazione etica e consenso alla partecipazione: Non applicabile.

Ricevuto per la pubblicazione: 15 February 2022.

Revisione ricevuta: 15 February 2022.

Accettato per la pubblicazione: 15 February 2022.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright: the Author(s), 2022

Licensee PAGEPress, Italy

Italian Journal of Wound Care 2022; 6(1):85

doi:10.4081/ijwc.2022.85

INTRODUZIONE

Se gli anni '60 dello scorso secolo sono stati la pietra miliare nell'ambito del *wound healing* con la dimostrazione che la guarigione delle lesioni avviene in ambiente umido,¹ l'inizio del 21° secolo è stato testimone di un notevole incremento di pubblicazioni, studi, ricerche sul rap-

porto microbiota-ulcera cutanea e microbiota-wound healing. Come si descriverà più diffusamente in seguito, il microbiota cutaneo, ovvero l'insieme di microorganismi che colonizza la pelle dell'ospite, è intimamente correlato con la salute e la malattia cutanea. Il dialogo costante e specifico tra la flora commensale e le cellule cutanee, entrambe dotate di elevata competenza immunologica e che regola l'omeostasi cutanea e promuove il ripristino della barriera danneggiata, è completamente sregolato nelle ferite croniche.² Come noto la guarigione delle ulcere è un processo complesso e molto organizzato, strettamente controllato dai diversi tipi di cellule della pelle attraverso la secrezione di fattori di crescita, citochine e chemochine. L'interruzione di questo processo impedisce il corretto ripristino della barriera cutanea e di conseguenza la ferita non guarisce e si cronicizza.³ Le ferite offrono l'opportunità alla flora residente e a quella ambientale di entrare nei tessuti sottostanti e trovare le condizioni ottimali per la loro colonizzazione e la loro crescita. Durante il normale processo di wound healing l'interazione dei microrganismi commensali con le cellule cutanee partecipa attivamente alla modulazione della risposta immunitaria innata; al contrario si sospetta che i microrganismi patogeni svolgano un ruolo sostanziale nel ritardare la guarigione delle ferite.³

IL METODO DI SEQUENZIAMENTO DEL DNA E LA METAGENOMICA

Il fondamentale passo in avanti nella conoscenza del microbiota cutaneo, delle sue caratteristiche, del rapporto microbo-ospite, microbo-microbo, microbo-cute-lesione cutanea è avvenuto con il superamento delle tradizionali tecniche di coltura che erano in grado di coltivare solo un numero limitatissimo dei suoi componenti in quanto la grande maggioranza è refrattaria alla coltivazione o non è in grado di crescere in condizioni di laboratorio. Attraverso il metodo di sequenziamento del DNA del microbiota viene sequenziato il gene per la subunità 16s dell'RNA ribosomiale che è condiviso da tutti i batteri, ma non dagli esseri umani e che funziona come un "codice a barre" per identificare e contare i batteri presenti; per i funghi, invece, viene sequenziato il gene per la subunità 18S rRNA.⁴ Gli studi condotti con questa metodica hanno evidenziato che la maggior parte dei batteri che colonizza il tessuto della ferita cronica appartiene a 21 famiglie; uno studio retrospettivo su larga scala del microbiota proveniente da 2963 campioni di ferite croniche di varia eziologia ha mostrato che *Staphylococcus* e *Pseudomonas* erano i generi più comuni, identificati rispettivamente nel 63% e nel 25%; *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* erano le specie predominanti e le specie di *Staphylococcus* resistenti alla meticillina erano identificate in circa il 25% delle ferite croniche. Da sottolineare che i batteri commensali, tra cui

le specie *Corynebacterium* e *Propionibacterium*, così come i batteri anaerobi, erano altamente prevalenti nei campioni di ferite croniche analizzati, ma anche che il microbiota delle lesioni croniche è distinto dal microbiota della cute sana circostante. Non sono state osservate differenze significative nella composizione del microbiota tra i tipi di ferite. Altri studi hanno identificato *S. aureus* come la specie più comune nelle ferite croniche di varia eziologia e nelle ulcere neuropatiche del piede diabetico.³ È stata ulteriormente identificata l'associazione tra composizione del microbiota e fattori clinici: un'elevata diversità microbica, nonché una relativa abbondanza di batteri anaerobici e proteobatteri Gram-negativi, sono state osservate nelle ulcere profonde e in quelle di lunga durata, mentre una grande abbondanza di *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus*, è stato riscontrato nelle ulcere superficiali e in quelle di breve durata. Lo stesso gruppo di studio ha valutato le dinamiche temporali del microbiota che colonizza le ulcere del piede diabetico evidenziando che cambiamenti rapidi e dinamici della sua composizione erano associati a una guarigione più rapida e a risultati migliori. Avvalendosi della metagenomica- la scienza che studia l'insieme dei diversi materiali genetici derivanti dalle specie presenti in un determinato ambiente, nel nostro caso quello derivante dal microbiota cutaneo umano, attraverso il sequenziamento del DNA di tutte le specie presenti (eucarioti, procarioti, virus/fagi)- alcuni autori hanno identificato differenze specifiche nel microbiota delle ulcere del piede diabetico che si correlano con gli esiti clinici della guarigione. Due ceppi di *S. aureus* (SA10757 e SA7372) sono risultati associati a lesioni croniche e l'inibizione della guarigione è stata confermata in modelli murini. Al contrario, le ferite infettate da un comune batterio ambientale, quale *Alcaligenes faecalis*, guarivano a velocità simili ai controlli. Ulteriori indagini hanno rivelato che *A. faecalis* era associato ad alti livelli di interleuchina-8 e altre citochine coinvolte nel processo di guarigione delle lesioni. Questi studi indicano che le differenze di livello funzionale tra le specie presenti nel microbiota o anche tra specifici ceppi di una medesima specie, possono svolgere un ruolo importante nel determinare l'andamento e gli esiti clinici delle ulcere croniche.³

IL BIOFILM

I microrganismi che costituiscono il microbiota della lesione che non guarisce hanno dimostrato di essere per lo più organizzati in biofilm, una complessa comunità microbica sviluppatasi da una singola specie batterica o fungina o da specie diverse o, ancor più frequentemente, da batteri e funghi che interagiscono tra loro, circondata da una matrice polimerica composta da polisaccaridi, lipidi, proteine e acidi nucleici. La prevalenza di biofilm in ulcere croniche valutate al microscopio e, in alcuni casi, con

associata analisi molecolare, è stata del 78,2%, variando tra il 60 e il 100%.⁵ Le interazioni dei microorganismi all'interno del biofilm hanno dimostrato di essere dinamiche e in grado di modificarne il comportamento con conseguente aumento della virulenza e la cronicizzazione della ferita.³

Il microbiota cutaneo, quindi, come organismo dinamico, intimamente correlato con le cellule dell'ospite che, attraverso un dialogo permanente finalizzato al mantenimento di una risposta immunologica efficace, si rende protagonista anche della salvaguardia della funzione di barriera sia integra che lesa.³

LA CUTE ORGANO IMMUNOLOGICO

Come noto la cute esercita molteplici funzioni tra cui quelle di barriera fisica, chimica e immunologica nei confronti dell'ambiente esterno. La sua struttura a "mattoni e cemento", il pH acido e il suo ruolo, complesso e articolato di organo immune, ne garantiscono questa funzione indispensabile per la sopravvivenza.²

Le cellule dei diversi strati dell'organo cute concorrono alla sua attività immunologica con meccanismi diversi. Ad esempio cheratinociti, fibroblasti, adipociti, melanociti e cellule endoteliali esprimono una vasta gamma di recettori di riconoscimento: *Pattern Recognition Receptors (PRR)* responsabili del riconoscimento dei germi patogeni, dell'attivazione del sistema immunitario innato e dell'immunità adattativa antigene specifica. I patogeni, a loro volta, sono in grado di esprimere molecole o porzioni di esse: i *Phatogen Associated Molecular Pattern (PAMP)* che possono essere rilevate da *PRR* specifici e innescare una risposta immunitaria a cascata. Tra le diverse classi di *PRR* i *Toll Like Receptors (TLRs)* meritano particolare attenzione. Ne sono stati identificati e caratterizzati diversi, ciascuno dei quali in grado di rilevare, ad esempio, specifici *PAMP* della membrana cellulare di batteri gram+, gram- o riconoscere genomi batterici e virali. La segnalazione dei *TLRs* svolge un ruolo essenziale nella difesa dell'ospite contro i segnali di pericolo innescando la produzione di una vasta gamma di citochine, chemochine, peptidi antimicrobici e fattori stimolatori oltre che rendendosi necessaria per l'attivazione dell'immunità adattativa coinvolta nella protezione a lungo termine.^{6,7}

I cheratinociti, le cellule dello strato più esterno della cute e quindi immediatamente esposto a qualsiasi variazione ambientale, producono anche dei *Peptidi Antimicrobici (AMPs)*, ad esempio beta defensine, catelicidine, proteine S 100 (psoriasina e calprotectina) in grado di aggredire in modo specifico i microorganismi.⁸

Nel derma l'attività immunologica, sia di immunosorveglianza che di risposta a lesioni/infezioni, è garantita da cellule di derivazione mieloidi (dendritiche, macrofagi, mastcells, eosinofili) e linfociti (T e B linfociti). Le cellule

mieloidi contribuiscono all'omeostasi cutanea secernendo i fattori di crescita necessari per la sopravvivenza di cheratinociti, fibroblasti e cellule endoteliali e alla sorveglianza immune svolgendo attività fagocitica e apoptotica, sostenendo l'integrità dei vasi e promuovendo la tolleranza antigenica; allo stesso tempo, garantiscono un intervento immediato in caso di flogosi con la produzione di mediatori che guidano l'attivazione di cellule dell'immunità locali e il richiamo di cellule dell'immunità periferiche. Costituiscono la congiunzione tra l'immunità innata e adattativa.² Anche le cellule linfocidi partecipano all'omeostasi cutanea e alla risposta infiammatoria con una varietà di cellule (T di memoria CD8, CD4 T_H1, T_H2, e T_H17 cellule, cellule T $\gamma\delta$, cellule NKT e cellule T regolatorie) ad esempio attraverso la produzione di cellule T della memoria residenti (Trm). Si tratta di una popolazione non circolante di cellule T che risiede nei tessuti con ruolo di immunosorveglianza e capacità di risposta rapida contro l'invasione di patogeni; nel derma sono presenti, ad esempio, cells Trm CD8+. Queste stesse si ritrovano anche nell'epidermide, in stretto contatto con i cheratinociti la cui produzione di citochine e chemochine risulta indispensabile per l'omeostasi delle cellule Trm stesse e il loro reclutamento in caso di infezione.^{8,9} Questi sinteticamente, più che parziali accenni al ruolo immunologico della cute, evidenziano come la complessità del network creato dalle sue varie componenti e in costante contatto con l'ambiente sia, al tempo stesso, finalizzata al mantenimento dell'omeostasi tissutale che alla protezione dell'ospite e abbia perciò sviluppato, in qualità di organo sentinella, un'enorme varietà di strategie difensive altamente specifiche e tra loro interconnesse.²

IL MICROBIOTA CUTANEO NON È UN SEMPLICE OSPITE

È ben noto, altresì, che ogni cm quadrato di cute ospita circa un milione di microorganismi di circa un migliaio di specie diverse, secondo la metagenomica¹⁰ e che ogni individuo adulto metta a disposizione circa 30 mq di habitat per i microbi, in relazione al fatto che la pelle umana non è una superficie piana: se lo fosse avrebbe una superficie pari a due mq in un individuo adulto. La presenza di circa cinque milioni di appendici, come follicoli piliferi e dotti sudoripari, ne aumenta notevolmente la superficie epiteliale che è accessibile in modo univoco al microbioma composto da batteri, funghi, virus, microeucarioti, parassiti. Questo insieme di microorganismi è definito residente o commensale in quanto non viene riconosciuto come potenzialmente aggressivo. Ciò significa, ed è di fondamentale importanza, che il sistema immunitario cutaneo è in grado di distinguere la flora residente da quella patogena. Tale riconoscimento avviene in età neonatale ed è correlato alla presenza di cellule T regolatorie (*Treg*)

che mediano la soppressione della risposta immune solo nei confronti dei commensali e non dei patogeni.¹¹ Ad esempio, il sistema immunitario dell'ospite riconosce lo *S. epidermidis* come commensale, ma in caso di presenza di *S. aureus*, patogeno, riconosce l'alfa tossina che esso stesso produce e attiva di conseguenza una citochina ad azione proinfiammatoria, IL-1, in grado di inibire le cellule *T reg* e impedire la tolleranza al patogeno.

Un altro ruolo essenziale dell'immunotolleranza cutanea nei confronti della flora residente è svolto dall'immunità omeostatica o adattativa che si sviluppa in assenza di infiammazione e che vede coinvolte le cellule dendritiche. È il caso, ad esempio, delle cellule di Langerhans (LC), sottinsieme specifico di cellule dendritiche. Storicamente considerate come cellule attivanti il sistema immunitario attraverso la presentazione dell'antigene, prove successive hanno supportato l'idea che partecipino alla promozione della tolleranza agli autoantigeni e alla flora commensale attraverso la produzione di specifiche cellule *T regolatorie*.^{2,9}

La composizione del microbiota cutaneo è influenzata da numerosi fattori quali il tipo di igiene, lo stile di vita, l'ambiente, la professione, l'età, oltre che le proprietà chimiche e fisiche della cute stessa che, come noto, ha una superficie per lo più asciutta, a pH acido (intorno a 5.6) e una temperatura inferiore a quella degli organi interni. Anche l'esfoliazione costante delle cellule epiteliali, tra le 600.000 e il milione/ora di cui il 10% ospita microbi, influisce sulla composizione del microbiota. Altri fattori condizionanti sono lo spessore cutaneo, la localizzazione e la profondità delle pieghe cutanee, la densità dei follicoli piliferi, la presenza degli annessi cutanei, ghiandole sudoripare e sebacee le cui secrezioni creano condizioni locali tali da inibire o sviluppare la crescita del microbiota. Nelle aree umide, come spazi interdigitali, ascelle, ombelico, inguine, vi è una situazione favorevole alla crescita di microorganismi di varie specie (*Corinebatteri* e *Stafilococchi* i dominanti); in aree più asciutte ed esposte ad ampie fluttuazioni di temperatura, come avambracci e gambe, ove le condizioni ambientali sono più ostili, sono maggiormente rappresentati i *Proteobatteri*, ad esempio *E. coli*. Le ghiandole sebacee assicurano un ambiente di crescita per anaerobi obbligati e facoltativi in quanto il sebo è ricco di lipidi di cui si nutrono. Le specie più presenti sono del genere *cutibatteri* (46%), *stafilococchi* (16%), miceti del genere *malassezia*. Il microbiota meno stabile è quello dei piedi, quello più stabile è quello delle mani. Il microbiota colonizza anche gli strati cutanei più profondi e il contenuto di nutrienti e acqua, a questo livello, ne condiziona l'entità; è presumibile che questa localizzazione sia particolarmente coinvolta nel meccanismo di difesa immunitaria dell'ospite.^{9,12}

La cute è comunque considerata come povera di nutrienti, ma il microbiota residente si è evoluto in modo da

utilizzarne tutti i limitati disponibili, in particolare aminoacidi e lipidi; è in grado di produrre una gamma di molecole sintetizzate de novo o metabolizzate da molecole derivate dall'ospite, fornendo l'opportunità di un cross-talk microbo-ospite. Queste interazioni tra microbiota e ospite possono essere bidirezionali, con metaboliti microbici che mediano la funzione della pelle e delle cellule immunitarie oppure con metaboliti dell'ospite che influenzano il metabolismo microbico, entrambe con conseguenze sul mantenimento del microbiota e sull'omeostasi cutanea. Come già accennato, il microbiota cutaneo è presente anche nel comparto subepidermico e quindi le interazioni mediate da metaboliti si verificano non solo sulla superficie cutanea, ma anche in profondità.

È evidente come la flora residente, con le sue precise caratteristiche, non abbia un ruolo di semplice ospite/spettatore bensì eserciti una spiccata azione di difesa impedendo la colonizzazione da parte di altri microorganismi con meccanismi diversi.

Con modalità indiretta, innanzitutto attraverso l'occupazione della cute e degli annessi in competizione serrata con altri microorganismi non commensali e, fondamentale, con la capacità di sostenere l'attività antimicrobica cutanea utilizzando alcuni prodotti del suo metabolismo. È il caso, ad esempio, di *Cutibacterium acnes*, *S. epidermidis*, *Malassezia spp.* che producono una lipasi che idrolizza i lipidi del sebo trasformandoli in acidi grassi liberi (FFAs) i quali a loro volta acidificano la cute aumentando la capacità antimicrobica, oppure, come nel caso del commensale nasale *C. accolens*, i cui FFAs esercitano oltre che l'acidificazione del pH anche un'azione inibitoria specifica sulla crescita del patogeno *S. pneumoniae*.^{11,12}

Con modalità diretta, invece, attraverso la sintesi di molecole antimicrobiche (AMPs): ad esempio lo *S. epidermidis* coagulasi negativo produce un suo specifico peptide antimicrobico che si oppone alla colonizzazione del patogeno *S. aureus*. Alcuni ceppi di *S. epidermidis* sintetizzano moduline solubili in fenolo (PSM) che, grazie alla loro caratteristica struttura, distruggono la membrana dei patogeni. Altri ceppi di questa specie possono produrre un lipopeptide che supporta la difesa antimicrobica dell'ospite; lo *S. epidermidis* può anche produrre acido lipoteicoico, un ligando TLR2 che svolge un ruolo importante nel ridurre l'infiammazione cutanea.^{11,12}

Le specie *Staphylococcus* residenti nella pelle, quindi, sono coinvolte in interazioni microbo-microbo con finalità vantaggiose per l'ospite. Ad esempio, *S. epidermidis* e *S. hominis* secernono peptidi antimicrobici che uccidono *S. aureus* e il trapianto di queste specie sulla cute di pazienti con dermatite atopica ha determinato una diminuzione della colonizzazione da parte di *S. aureus*. Un altro comune residente cutaneo, *Corynebacterium striatum*, agisce sul programma trascrizionale globale di *S. aureus* co-coltivato in modo da sopprimerne i geni correlati alla

virulenza e stimolare quelli associati al commensalismo. Questi dati suggeriscono che il ruolo del microbiota cutaneo vada oltre l'esclusione competitiva; evidenziano la possibilità che questi microorganismi si impegnino in una rete di interazioni microbo-microbo al fine di sintonizzare il comportamento dei loro co-residenti con modalità molto specifiche e mirate.¹³

LE INTERAZIONI OSPITE-MICROBO E MICROBO-MICROBO

Il microbiota svolge anche un ruolo importante nella maturazione e nell'omeostasi dell'immunità cutanea intesa come risposta adattativa alla flora residente che si sviluppa in assenza di infiammazione, come già accennato, in contrasto con la risposta immune nei confronti della flora patogena.¹³ Il microbiota cutaneo modula l'espressione di vari fattori innati, tra cui l'interleuchina 1a (IL-1a), componenti del complemento e peptidi antimicrobici (AMP) prodotti da cheratinociti e sebociti. Gli AMP derivati da cellule cutanee costituiscono, come noto, una vasta gamma di famiglie proteiche tra cui catelicidine, β -defensine, calprotectina (complesso di S100A8/S100A9), lisozima, RNasi-7.¹⁰ Sebbene alcuni AMP siano espressi costitutivamente, altri possono essere stimolati da membri specifici del microbiota come *Cutibacterium* o prodotti dai microbi stessi, come già descritto. Non è ancora chiaro come la combinazione di AMP indotti dal microbiota e prodotti dal microbiota plasmi le comunità microbiche, ma è probabile che questa segnalazione multidirezionale svolga un ruolo importante nell'ecologia delle comunità microbiche cutanee. I batteri residenti coinvolgono attivamente l'immunità dell'ospite attraverso la barriera cutanea intatta e attivano specifiche popolazioni di cellule immunitarie in modo dipendente da specie e ceppi. Ad esempio, alcuni ceppi di *S. epidermidis* inducono l'attivazione delle cellule T IL-17 CD8 specifiche che proteggono dalle infezioni cutanee inducendo i cheratinociti a produrre AMP: questo meccanismo è chiamato *protezione eterologa*.¹³

Un'ulteriore interazione ben definita che esemplifica l'immunità omeostatica comporta la presentazione del complesso di istocompatibilità maggiore non classico (MHC) dell'antigene derivato dal commensale. Nei topi, la presentazione dei peptidi di *S. epidermidis* da parte di molecole MHC alle cellule *Teff* si traduce in una risposta immunitaria non infiammatoria, distinta dalla risposta indotta da agenti patogeni. Questa risposta è caratterizzata da immunità protettiva di barriera, immunoregolazione e riparazione dei tessuti.¹¹

Il sistema immunitario, arbitro delle interazioni ospite-microbo, deve monitorare e campionare continuamente la moltitudine di molecole derivate da ospite e microbi e le loro interazioni. Un esempio di questa necessaria sorve-

glianza immunitaria è il rilevamento dei metaboliti da parte delle cellule MAIT (Mucosal associated invariant T cells). Distinte dalle cellule T tradizionali, le cellule MAIT costituiscono un abbondante sottoinsieme di linfociti T innati e supportano la risposta adattativa. Sono protettive nei confronti dei patogeni e possono essere attivate dal microbiota commensale in modo da interagire con la molecola del complesso maggiore di istocompatibilità di classe 1 (MR1) che cattura e presenta antigeni microbici derivati in particolare dalla riboflavina (Vit.B), la cui biosintesi è ampiamente conservata tra batteri e funghi ma non tra i mammiferi. Recenti ricerche hanno dimostrato che nei topi, l'associazione cutanea di *S. epidermidis* e di altri commensali che codificano la biosintesi della riboflavina provoca l'espansione delle cellule MAIT residenti nella pelle e la produzione di citochine. Tuttavia, l'associazione con un mutante della biosintesi di riboflavina di *S. epidermidis* non è in grado di indurre la stessa risposta. La maggior parte delle specie all'interno dei taxa cutanei batterici dominanti: *Corynebacteriaceae*, *Propionibacteriaceae* *Staphylococcaceae* codifica la biosintesi di riboflavina. Ciò induce a ritenere che l'immunità specifica MAIT, attraverso il riconoscimento degli intermedi della sua biosintesi, svolga un ruolo importante nella salute della barriera cutanea. Studi recenti evidenziano che metaboliti batterici, farmaci e derivati della vitamina B9 possono essere attivanti o inibitori per le cellule MAIT. Sono necessari ulteriori approfondimenti per determinare l'identità di altri metaboliti microbici e sostanze che legano MR1 e chiarire il loro ruolo funzionale nell'omeostasi immunitaria cutanea *cellulo-mediata MAIT*.¹¹

DISBIOSI E PATOGENICITÀ CONTESTUALE

L'alterazione dell'equilibrio ospite - microbiota in seguito a modificazioni della barriera cutanea o del sistema immunitario, determina una *disbiosi* ovvero la proliferazione di una flora microbica opportunistica e patogena e una risposta immune incontrollata che, a loro volta, potranno amplificare il quadro patologico stesso. Si pensa comunemente che i *patobionti* siano commensali trasformati in patogeni da condizioni ambientali predisponenti, ma in realtà le specie microbiche esistono in un *continuum tra mutualismo e patogenicità* strettamente correlato alla situazione metabolica e immunologica dell'ospite e alla presenza di alcuni partners microbici.^{10,11}

Tradizionalmente il termine "*patobionte*" è stato applicato agli organismi potenzialmente patogeni che spesso, però, sono in grado di colonizzare l'ospite senza indurre patologia. La transizione dal commensalismo (ad esempio sulla superficie della pelle o in un follicolo) alla patogenicità (ad esempio nel flusso sanguigno) è un processo complesso e potenzialmente dispendioso per il microbo. La cute è un'imponente barriera fisica e anche se

alterata il patogeno deve respingere gli attacchi della risposta immunitaria innata, sostenuta ad esempio dalle proteine antimicrobiche, dalle proteasi e dalle specie reattive dell'ossigeno. Inoltre, gli aspiranti patogeni devono essere in grado di indurre l'espressione di geni che consentono l'adesione, l'invasione e l'evasione immunitaria, cioè i fattori di virulenza.¹³

In sintesi: i microbi mostrano una patogenicità contestuale. Fattori legati all'ospite, come l'alterazione della barriera cutanea e l'immunosoppressione, spingono il microorganismo verso la patogenicità. Condizioni di omeostasi lo inducono invece verso il comportamento commensale-mutualistico. Dal punto di vista microbico l'espressione genica della virulenza e le interazioni microbo-microbo possono indurlo verso il commensalismo-mutualismo o la patogenicità. In una relazione mutualistica l'ospite fornisce sostanze nutritive mentre il microbo promuove l'omeostasi epiteliale e immunitaria nonché la resistenza ai patogeni; in una relazione patogena il microbo invade anche i tessuti dermici sottostanti causando una reazione infiammatoria con la possibilità di beneficiare della risposta infiammatoria dell'ospite.¹³

Un tipico esempio di patogenicità contestuale è rappresentato, come già evidenziato, da *S. epidermidis* e *S. aureus*: il primo è orientato al comportamento mutualistico, il secondo alla patogenicità. Il patogeno virulento *S. aureus* è tra le principali cause di infezioni acquisite in comunità e nosocomiali, ma allo stesso tempo, colonizza in modo asintomatico il 20-40% della popolazione generale, a sottolineare la variabilità del suo range di patogenicità. Tale variabilità potrebbe essere sostenuta dalla presenza di commensali, quali specie diverse di *Corinebatteri*, in grado di diminuire l'espressione del locus di quorum sensing. Per *Quorum Sensing* si intende la capacità dei microbi di aumentare la loro virulenza attraverso molecole di segnale in grado di innescare un meccanismo di comunicazione tra loro. In questo modo i *Corinebatteri* antagonizzerebbero la virulenza di *S. aureus* che diverrebbe presente come commensale. Al contrario, specie di *Cutibatteri* in grado di produrre coproporfirina III, come il *C. acnes*, sarebbero in grado di indurre l'aggregazione di *S. aureus* sotto forma di biofilm.¹³ Allo stesso tempo *C. acnes* è in grado di fermentare il glicerolo in acidi grassi a catena corta che sopprimono la crescita di un particolare ceppo di *S. aureus* (USA300) virulento e resistente alla meticillina. Questi dati suggeriscono ancora una volta che complesse reti di interazioni microbo-microbo possono governare l'infiammazione e la malattia dell'ospite in modo dipendente dal ceppo e dal contesto.¹³

Una gamma simile di effetti patologici e benefici è stata dimostrata anche per altri microbi; ad esempio i virus, quali gli herpesvirus, possono causare patologie cutanee acute tra cui varicella, (virus della varicella zoster) e ulcere labiali ricorrenti (HSV1 e HSV2). Tuttavia, dopo

che l'infezione acuta si è risolta, gli herpesvirus persistono in modo latente per tutta la vita in qualità di coloni. Nei topi, questa latenza ha dimostrato di stimolare il sistema immunitario con modalità protettiva nei confronti dei patogeni batterici per mesi.

Helicobacter pylori colonizza metà della popolazione umana, ma solo in una piccola percentuale può determinare ulcera peptica e concorrere alla patogenesi dell'adenocarcinoma gastrico. In contesti più estremi di predisposizione dell'ospite molte altre specie microbiche hanno potenziale per causare malattia: i pazienti con immunodeficienza primaria (PID), ad esempio, sviluppano infezioni cutanee croniche e gravi, molte delle quali indotte dal microbiota residente.¹³

ELUSIONE IMMUNITARIA

Al contrario, le specie di *Mycobacterium leprae* e *tuberculosis*, note per la capacità di causare gravi malattie sistemiche, possono persistere subclinicamente all'interno di un granuloma per tutta la vita dell'ospite. *M. tuberculosis* colonizza un quarto della popolazione mondiale (1,7 miliardi di persone) sotto forma di infezione latente; l'Organizzazione Mondiale della Sanità stima che nel 2015 si siano verificate 10,4 milioni di nuove infezioni. Tra i portatori asintomatici di *M. tuberculosis*, solo il 10% presenterà attivazione di tubercolosi nel corso della vita. Nel caso della lebbra, tra l'infezione da *M. leprae* e i diversi spettri della manifestazione clinica possono trascorrere 2-12 anni (o anche più decenni) durante i quali il batterio sfugge facilmente all'immunità dell'ospite. È da sottolineare il fatto che la maggior parte degli esseri umani che ospitano *M. tuberculosis* e *M. leprae* non mostri patologie evidenti né muoia a causa di questi infezioni. Ciò suggerisce che ancora molto vi sia da chiarire circa i meccanismi di evasione immunitaria a lungo termine e che la definizione tradizionale di "colono" potrebbe modificarsi per includere un organismo come *M. tuberculosis* che, se da un lato è un agente patogeno responsabile della morte di più di un milione di persone ogni anno, dall'altro vive in modo asintomatico in miliardi di persone e provoca la morte solo di una piccola percentuale dei suoi ospiti.¹³

Un meccanismo recentemente scoperto di evasione immunitaria micobatterica dell'ospite coinvolge il sistema nervoso. *Mycobacterium ulcerans* causa l'ulcera di Buruli, un'ulcera necrotica ad andamento progressivo che è la terza malattia micobatterica più comune in tutto il mondo. È indolore, il che contribuisce a ritardare il trattamento e quindi aumenta la necessità di interventi più demolitivi nelle fasi infettive successive, quando l'unico trattamento disponibile è la resezione chirurgica. *M. ulcerans* produce una tossina, il micolattone, essenziale per la virulenza che induce analgesia attraverso i recettori di angiotensina II, cox-1 e prostaglandina E₂, con conse-

guente attivazione dei canali del potassio TRAAK e iperpolarizzazione cellulare. La scoperta di questo meccanismo d'azione fornisce possibili vie alla biomimetica terapeutica per alleviare il dolore e allo sviluppo di terapie contro *M. ulcerans*, ma dimostra anche una nuova modalità di interazione patogeno-ospite in cui il sistema nervoso periferico è coinvolto direttamente.

Oltre a eludere l'immunità e determinare infezione, i micobatteri possono anche persistere per decenni all'interno dei granulomi costituiti da aggregati organizzati di macrofagi. I batteri che vivono all'interno di un granuloma, in equilibrio con l'ospite, possono essere considerati una forma di colonizzazione dei tessuti. Nell'intestino, ad esempio, alcuni sottoinsiemi di batteri commensali colonizzano intracellularmente le cellule dendritiche CD11c in topi sani e promuovono risposte innate delle cellule linfoidi che impediscono la diffusione sistemica di questi batteri, nonché la produzione di IL-10 che protegge dall'infiammazione e dai danni intestinali. Questi dati confermano che i coloni commensali possono risiedere non solo sulla superficie dell'ospite, ma anche all'interno delle cellule e dei tessuti dell'ospite stesso e che possono determinare un equilibrio tra risposte immuno-reattive e immuno-soppressive nell'ospite. I micobatteri presenti nei granulomi possono infettare nuovi macrofagi portando alla disseminazione, tuttavia, nell'80-90% dei pazienti sani con tubercolosi latente, la riattivazione non si verifica durante la vita dell'ospite. In questi pazienti, *M. tuberculosis* persiste all'interno dei macrofagi, utilizzando una varietà di strategie tra cui pompe di efflusso che promuovono la tolleranza ai farmaci, aumento della biosintesi della parete cellulare e modificazioni trascrizionali globali per sopravvivere in condizioni anaerobiche. All'interno di un singolo ospite, i granulomi possono risolversi in modo variabile: alcuni diventano sterili, altri ospitano batteri latenti e alcuni consentono ai batteri di sfuggire in un modo che non dipende dall'ospite o dalle caratteristiche genetiche batteriche. Pertanto, anche per un singolo agente patogeno all'interno di un singolo ospite, non è ancora chiaro come le specifiche del contesto influenzino l'esito di un incontro microbo-ospite.¹³

Anche la componente *micotica* del microbioma cutaneo mostra una patogenicità contestuale. Il componente fungino più rappresentato nell'ambito del microbiota cutaneo è costituito dal genere *Malassezia* che attualmente comprende 18 specie e numerosi ceppi funzionalmente distinti di lieviti basidiomiceti lipido-dipendenti. Nell'ultimo decennio, nuovi strumenti per la coltura, il rilevamento e la manipolazione genetica di *Malassezia* ne hanno rivelato non solo l'ubiquità sulla cute, ma anche la sua complessa relazione con l'ospite che varia con il sito del corpo, l'età e la suscettibilità dell'ospite stesso e può essere in qualsiasi circostanza una relazione commensale, mutualistica o patogena. In età neonatale viene ricono-

sciuta come commensale dalle *cells T reg* e media la risposta adattativa. Nell'ambito del mutualismo, ad esempio, è stato ipotizzato che possa proteggere la cute attraverso il metabolismo del sebo e la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), come l'acido azelaico che ha proprietà antibatteriche e antimicotiche. Al contrario è chiaramente stabilito il suo ruolo patogenetico nel causare forfora e dermatite seborroica, ma se ne ipotizza un ruolo anche in patologie infiammatorie croniche come la dermatite atopica, la psoriasi, il morbo di Crohn e anche nel carcinoma duttale pancreatico.¹⁴

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il sistema immunitario cutaneo si è evoluto a stretto contatto con i microrganismi residenti nella pelle per consentire il mantenimento dei partners commensali e l'eliminazione di possibili agenti patogeni. Il microbiota cutaneo, le cellule epiteliali e i bracci innati e adattativi del sistema immunitario per funzionare al meglio devono comunicare in modo efficace. I cheratinociti possono iniziare questo dialogo rilevando i microrganismi, in particolare i modelli molecolari associati ai patogeni (*PAMP*), attraverso i recettori di riconoscimento dei pattern (*PRR*). Il legame dei *PAMP* ai *PRR* innesca risposte immunitarie innate con conseguente secrezione di peptidi antimicrobici che possono rapidamente uccidere e/o inattivare una vasta gamma di microrganismi, tra cui funghi, batteri e parassiti. Alcuni peptidi antimicrobici sono espressi costitutivamente come prima linea di difesa, mentre l'espressione di altri può essere transitoria e controllata da membri del microbiota cutaneo. I commensali cutanei sono essenziali per l'educazione del sistema immunitario che durante il periodo neonatale ne consente la colonizzazione in assenza di risposte infiammatorie. Questa tolleranza è legata alla presenza di *cellule T regolatorie*, (un sottogruppo di linfociti che si accumula nella cute neonatale, in concomitanza con la morfogenesi del follicolo pilifero e che riconosce i commensali impedendo la risposta infiammatoria nei loro confronti). Nello stesso tempo, però, la tolleranza non è estesa a tutte le specie; la presenza di microrganismi diversi dai residenti ha dimostrato di suscitare reazioni diverse del sistema immunitario come la produzione di citochine che contribuiscono alla difesa dell'ospite e all'infiammazione cutanea.^{11,15} Così come topi colonizzati localmente con *S. epidermidis* presentano concomitante protezione contro infezioni fungine e parassitarie, se la colonizzazione di *S. epidermidis* si attua attraverso iniezione intradermica si osservavano risposte infiammatorie classiche: infiltrazione di monociti, neutrofilo e *cells T eff* interferon- γ (IFN γ)_{eff} a conferma che i commensali sono in grado di indurre aspetti distinti del sistema immunitario nella risposta a esposizioni di possibili agenti patogeni.^{11,15}

Le ricerche dovranno chiarire e approfondire ulteriormente il comportamento dipendente dal contesto da parte dei microbi residenti, le interazioni microbo-microbo, le interazioni ospite-microbo e le differenze specifiche dei ceppi per comprendere i meccanismi che orientano un microorganismo verso la cooperazione o l'aggressività. La comprensione sempre più specifica delle modalità con cui i ceppi batterici commensali attivano specifiche popolazioni di cellule immunitarie, condurrà alla possibilità di sfruttare questa specificità ingegnerizzando microbi per fornire citochine, piccole molecole o vaccini a specifiche popolazioni di cellule immunitarie attivate attraverso la barriera cutanea intatta. Una comprensione più chiara della fitta rete di interazioni microbo-microbo ci consentirà anche di fornire terapie più mirate per la disbiosi, chiaramente implicata nella dermatite atopica e in altre dermatosi quali psoriasi, idrosadenite suppurativa e lupus eritematoso. Nell'intestino, l'utilizzo di microbi per correggere la disbiosi ha avuto successo nel caso di trapianti fecali per infezioni da *Clostridium difficile* e più recentemente nell'uso di un *Lactobacillus plantarum* simbiotico per prevenire la sepsi neonatale. Simili terapie microbiche *in vivo* per la cute non sono ancora state sviluppate, ma lo sfruttamento delle proprietà immuni o antimicrobiche dei batteri ha un grande potenziale futuro. A tal proposito l'alterazione della componente lipidica cutanea composta fondamentalmente da ceramidi, squalene, esteri della cera, colesterolo, trigliceridi e acidi grassi liberi potrebbe avere importanti conseguenze negative sulla composizione e sulle funzioni del microbiota, ma se correttamente ripristinata potrebbe ristabilire la crescita di commensali con proprietà immuni inalterate.¹³

Un'altra importante categoria di interazioni microbo-ospite, ancora non esplorata appieno, riguarda effetti tra microbi in siti diversi: ad esempio intestino e cute. Recentemente il blocco del checkpoint immunitario ha raggiunto un successo senza precedenti nel trattamento di più tumori della pelle che in precedenza erano associati ad alti tassi di mortalità, tra cui il melanoma metastatico, il carcinoma a cellule squamose e il carcinoma a cellule di Merkel. Sebbene si tratti di tumori cutanei, i batteri intestinali commensali sono stati implicati nell'efficacia delle immunoterapie antitumorali in distretti distanti; è necessario approfondire ulteriormente la conoscenza delle modalità con cui il microbiota cutaneo influenza le risposte immunitarie sistemiche o in distretti distanti tra loro. I processi che in precedenza si pensava coinvolgessero un'inflammatione limitata alla cute, come la psoriasi a placche, sono stati già da tempo correlati a un aumento

delle comorbilità infiammatorie sistemiche, quali la malattia cardiovascolare aterosclerotica e la sindrome metabolica. L'insieme di queste osservazioni evidenzia come gli effetti del microbiota cutaneo sul sistema immunitario possano avere sequele sistemiche ad ampio raggio e, nel contempo, ne ipotizza potenzialità terapeutiche in passato inimmaginabili. La crescita esponenziale degli studi in tal senso negli ultimi anni ne conferma l'importanza e ne amplia gli orizzonti anche nell'ambito del *wound healing*.¹³

BIBLIOGRAFIA

1. European Wound Management Association (EWMA). Position Document: Wound Bed Preparation in Practice. London: MEP Ltd, 2004
2. Nguyen AV, Soulika AM. The dynamics of the skin's immune system. *Int J Mol Sci* 2019;20:1811.
3. Tomic-Canic M, Burgess JL, O'Neill KE, et al. Skin microbiota and its interplay with wound healing. *Am J Clin Dermatol* 2020;21:36-43.
4. Ferretti P, Farina S, Cristofolini M, et al. Experimental metagenomics and ribosomal profiling of the human skin microbiome. *Exp Dermatol* 2017;26:211-9.
5. Malone M, Bjarnsholt T, McBain AJ, et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *J Wound Care* 2017;26:20-25.
6. Matejuk A. Skin Immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2018;66:45-54.
7. Sun L, Liu W, Zhang LJ. The role of toll-like receptors in skin host defense, psoriasis, and atopic dermatitis. *J Immunol Res* 2019;2019:1824624.
8. Piipponen M, Li D, Landén NX. The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *Int J Mol Sci* 2020; 21:8790.
9. Sanford JA, Gallo RL. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Semin Immunol* 2013;25:370-7.
10. Ederveen THA, Smits JPH, Boekhorst J, et al. Skin microbiota in health and disease: From sequencing to biology. *J Dermatol* 2020;47:1110-8.
11. Swaney MH, Kalan LR. Living in Your Skin: Microbes, Molecules, and Mechanisms. *Infect Immun.* 2021;89: e00695-20.
12. Skowron K, Bauza-Kaszewska J, Kraszewska Z, et al. Human skin microbiome: impact of intrinsic and extrinsic factors on skin microbiota. *Microorganisms* 2021;9:543.
13. Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. *Nature* 2018;553:427-436. Erratum in: *Nature* 2018;555:543.
14. Vijaya Chandra SH, Srinivas R, Dawson TL Jr, Common JE. Cutaneous *Malassezia*: Commensal, Pathogen, or Protector? *Front Cell Infect Microbiol* 2021;10:614446.
15. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:143-155.