

CARATTERIZZAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELLE POPOLAZIONI CELLULARI PRESENTI IN CORSO DI GASTRITE DA *HELICOBACTER PYLORI* NEL CANE

Rossi G., Fortuna D.^o, Ghiara P.* , Renzoni G., Braca G., Taccini E.

Dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti - Pisa.

^oLibero Professionista.

*Chiron Vaccines S.p.a., Siena.

Introduzione

Helicobacter pylori, batterio spiraliforme G-, colonizza la mucosa gastrica dell'uomo inducendo una flogosi cronica che determina con il tempo l'insorgenza di gastrite interstiziale cronica attiva, modificazioni metaplastico-displastiche dell'epitelio gastrico e atrofia della mucosa. Tali condizioni patologiche favoriscono l'insorgenza di erosioni-ulcere mucosali e persino modificazioni neoplastiche come MALT-omi o carcinomi gastrici. Vari modelli animali sono stati proposti per lo studio della patogenesi delle lesioni batterio-indotte e dei meccanismi immunopatologici che, in ordine temporale, rappresentano la base per lo sviluppo delle lesioni istopatologiche. Ad oggi, il modello animale più nuovo e rispondente sembra essere rappresentato dal Beagle xenobiotico (1). La presente ricerca prende in esame in ordine cronologico gli aspetti più caratteristici della flogosi gastrica indotta dalla infezione sperimentale del cane beagle xenobiotico con *H. pylori* tramite la caratterizzazione immunoistochimica delle sue diverse componenti cellulari e citochimiche.

Materiali e Metodi

Tre cani Beagle di 4-6 mesi d'età (Morini s.a.s, S. Polo D'Enza, Italia), selezionati in base all'assenza di IgG sieriche individuabili in W.B. ed in ELISA nei confronti di *H. pylori* sono stati infettati come descritto in precedenza (1) con un ceppo di *H. pylori* SPM 326s adattato nel topo. I cani, osservati giornalmente dal punto di vista clinico hanno manifestato, nella prima settimana P.I. sintomi gastrointestinali quali vomito e diarrea. Esami endoscopici sono stati effettuati a 1, 2, 4, 8, 12, 18 e 24 settimane, tramite endoscopia (Pentax pediatric-bronchoscope;

Pentax Technologies, Zaventem, Belgium) durante i quali è stato valutato l'aspetto macroscopico della mucosa gastrica e sono state prelevate biopsie, rispettivamente dalle regioni dell'antro, corpo, fondo e cardias, per effettuare il test dell'ureasi, esami microbiologici e biologico-molecolari nonché indagini istologiche ed immunoistochimiche. I campioni fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina sono stati sezionati a 3µm di spessore per le indagini istopatologiche tramite colorazione con ematossilina-eosina ed alcian-PAS. Sezioni simili sono state utilizzate per indagini immunoistochimiche secondo le tecniche ABC-perossidasi e ABC-fosfatasi alcalina, usando come anticorpi primari: mAb anti Human IL-8 (Clone DM/C7, Genzyme Diagnostics, Cambridge MA), mAb anti Human Monocytes/Macophages (Serotec Ltd, Oxford UK), mAb rat-anti Human CD3 (Serotec Ltd), mAb rat-anti Canine CD4 (Serotec Ltd), mAb rat-anti Canine CD8 (Serotec Ltd.), mAb anti Canine CD21 (VMRD Inc., Pullman, WA) e mAb anti Canine neutrophils (VMRD Inc.), al fine di caratterizzare le differenti popolazioni cellulari rappresentanti la flogosi nella sua evoluzione. Le sezioni, precedentemente adese su vetrini pretrattati (Bio-Optica, Milano, Italy), sono state sottoposte, dopo deparaffinatura, ad un trattamento con forno a microonde a 650W per 10', utilizzando come tampone per l'immersione dei vetrini un tampone citrato 10mM a pH 6.0. Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati Horse-anti mouse biotinilato e Rabbit-anti rat biotinilato (DAKO, Milano, Italy) e la reazione è stata sviluppata con 3-1-Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e, nel protocollo di doppia o tripla marcatura, il secondo cromogeno utilizzato è stato il VIP (Sigma) ed il terzo il Vector Red (Sigma), utilizzando per la controcolorazione nucleare il Methyl Green (Sigma).

Risultati

L'esame endoscopico ed istologico della mucosa gastrica affettuato a tempo 0 era normale in tutti e tre i cani mentre, nelle sezioni provenienti dalle biopsie prelevate ad 1 settimana P.I., in concomitanza con la fase acuta e sintomatica dell'infezione, era possibile osservare una marcata iperemia ed edema della lamina propria mucosale, in particolare nel corpo e nell'antro. A questo periodo si osservava istologicamente un'antrite acuta caratterizzata da notevole infiltrazione di polimorfonucleati a livello della lamina propria intorno alle ghiandole che, in molti casi, apparivano fortemente

alterate. Un notevole numero di neutrofili era inoltre osservabile, anche tramite marcatura immunohistochimica, sparso sia subito al di sotto dell'epitelio che libero nel muco sovrastante, suggerendo fenomeni transcitosici attraverso l'epitelio stesso. Contemporaneamente, sparse cellule mononucleate e numerose cellule epiteliali delle cripte ghiandolari più profonde e maggiormente interessate dal fenomeno flogistico acuto manifestavano una chiara positività citoplasmatica per IL-8. L'aspetto istologico delle biopsie prelevate a due settimane P.I. denunciava un notevole decremento dei neutrofili e contemporaneamente l'aumento di mononucleati, per lo più linfociti CD3+ e rare plasmacellule.

La presenza di una popolazione linfocitaria CD3+ ed in prevalenza CD4+, diffusa e più abbondante nel corion interghiandolare nei campioni prelevati a 4 settimane PI, si accompagnava a chiari segni di erosione superficiale dell'epitelio. In particolare nell'antro la sofferenza epiteliale si manifestava tramite degenerazione vacuolare, picnosi e ressi nucleare nonché perdita della porzione apicale mucosecemente da parte delle cellule. In ottava settimana P.I. era osservabile, anche endoscopicamente, una caratteristica gastrite follicolare con aspetto "varioliforme" della mucosa che, istologicamente, presentava l'aspetto tipico della gastrite interstiziale con infiltrato cellulare di tipo linfocitario diffuso ora a banda e caratterizzato da elementi CD3+, oppure organizzato in strutture follicolari con porzione centrale costituita da linfociti CD21+ e porzione corticale da LT CD3+/CD4+. Nello stesso periodo si osservava la presenza di cellule macrofagiche con chiara positività citoplasmatica per le proteine di 35 e 53kda, tipiche di *H. pylori*. A partire dalla 12^a settimana fino alla 24^a si osservava una espansione delle strutture follicolari e, successivamente, una diffusione dell'infiltrato linfocitario in forma diffusa a tutto il corion, in particolare a livello dell'antro dove la presenza di neutrofili dispersi nell'infiltrato mononucleato suggeriva il tipico aspetto della flogosi cronico-attiva. In questa fase la popolazione linfocitaria risultava costituita oltre che da una maggioranza di cellule CD4+ anche da cellule CD8+ localizzate per lo più in posizione iuxta-ghiandolare o immediatamente sub-epiteliale. In questo stadio avanzato dell'infezione si evidenziava inoltre un marcato cambiamento nella popolazione delle mucine documentato tramite colorazione con alcian-PAS da una deplezione progressiva di cellule epiteliali PAS+ dell'antro.

Discussione

L'infezione da *H. pylori*, al suo prodursi evoca una risposta flogistica aspecifica di tipo acuto e, successivamente, una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediato che si rivela dinamicamente simile a quella indotta da altre noxae particolari quali *Mycobacterium spp.* e *Leishmania spp.*, del tutto inefficace nel debellare l'infezione stessa. La presenza di antigeni batterici quali quelli codificati dalla regione "cag" o isola di patogenicità (PAI) nonché di fattori chemiotattici presenti sia a livello epiteliale che trasportati nella lamina propria causano infatti il reclutamento e l'attivazione di cellule infiammatorie mediante l'attivazione diretta delle cellule del sistema immunitario e la secrezione di citochine proinfiammatorie da parte dell'epitelio danneggiato. Le osservazioni effettuate fino ad oggi sull'uomo sembrano confermate da quanto osservato nel cane sperimentalmente infetto in cui la stadiazione delle lesioni istopatologiche, se caratterizzata immunoistochimicamente, mostra una precoce fase in cui la flogosi acuta è caratterizzata dalla presenza di abbondante infiltrato di polimorfonucleati, in concomitanza con l'espressione da parte delle cellule epiteliali e di taluni mononucleati di IL-8. Questa chemochina prodotta da varie categorie cellulari agisce rallentando i neutrofili circolanti e facilita il loro passaggio attraverso l'endotelio capillare e la concentrazione nel focolaio di flogosi. L'IL-8 risulta inoltre un importante fattore di chemiotassi per i LT "naive" ossia non ancora differenziati in CD8+ o CD4+. Come osservato anche nell'uomo (2), nel cane l'infiltrazione precoce di neutrofili sembra mediata dalla produzione di questa chemochina poichè la sua presenza non è stata evidenziata nelle sezioni di biopsie prelevate prima dell'infezione o dopo la seconda settimana da essa. L'IL-8 risulta infatti essere specificatamente indotta dai prodotti derivanti da batteri appartenenti a ceppi di *H. pylori* citotossici (Tipo I) come quello utilizzato nell'infezione dei tre cani (3, 4). Nel cane sperimentalmente infetto si osserva come al cronicizzare dell'infezione, oltre alla comparsa di lesioni macro e microscopiche caratterizzate da erosione epiteliale e vacuolizzazione cellulare mediate soprattutto dalla citotossina *VacA* di *H. pylori*, vi sia una progressiva infiltrazione di cellule mononucleate di tipo T /CD3+. Tale infiltrazione indica un tentativo di risposta cellulo-mediata specifica in aggiunta alla risposta umorale, mucosale e sistemica, parzialmente inefficace che culmina con la strutturazione di questo infiltrato in veri e propri follicoli linfoidi similmente a quanto descritto negli stadi cronici di infezione da *H. spp.* nell'uomo (5,

6) e negli animali infetti spontaneamente o sperimentalmente (7-9). Queste strutture linfoidi organizzate (area centrale CD21+ ed area corticale CD3+/CD4+) possono quindi ritenersi conseguenti ad una stimolazione persistente del sistema immunitario con reclutamento “in situ” di LT specifici (10). E’ stato inoltre descritto più volte in campo umano come in alcuni individui tali strutture linfoidi gastriche precedano lo sviluppo di veri e propri B-linfomi o MALT-omi (11). Il modello canino può quindi aprire nuove prospettive anche per lo studio del ruolo dell’infezione cronica da *H. pylori* nell’eventuale determinismo dello sviluppo di patologia neoplastica.

I risultati della caratterizzazione dei linfociti T infiltranti (per lo più LT CD3+/CD4+) concordano inoltre con recenti acquisizioni secondo le quali in corso di gastrite antrale *H. pylori*-associata siano le stesse cellule mucosali ad esprimere sulla loro membrana molecole appartenenti alla classe II del sistema maggiore di istocompatibilità (MHCII) assumendo il ruolo tipico delle cellule dendriche di cellule “presentanti l’antigene” (APC). Tale presentazione induce la proliferazione specifica dei LT CD4+ che a loro volta risultano suddivisi in Th1 e Th2. Il fatto che l’infezione sperimentale con *H. pylori* nel cane induca una risposta umorale caratterizzata per lo più da IgG 1 ma soprattutto da IgG2a (1) similmente a quanto osservato anche nel topo infettato con *H. felis* o con *H. pylori* (12) o nell’uomo infetto e con gastroduodenopatia, porta a pensare che l’infezione si traduca in una attivazione predominante dei LT CD4+/Th1. Quest’ultima categoria di cellule risulta essere maggiormente rivolta verso l’induzione alla produzione di citochine proinfiammatorie (6) venendo, in definitiva, ad aumentare il danno tissutale. Ciò giustifica la ricerca di nuove “presentazioni” degli antigeni di *H. pylori* che, somministrate, evocano una risposta CD4+ maggiormente diretta nella selezione di cellule Th2 correlate con la produzione di anticorpi capaci di conferire protezione all’ospite. In conclusione, il cane beagle xenobiotico infettato con *H. pylori* di Tipo I risulta un buon modello per lo studio delle patologie gastroduodenali *H. pylori*-indotte in quanto mima numerosi aspetti clinici nonchè, dal punto di vista istopatologico, ripropone con notevole fedeltà gli eventi della flogosi acuta e cronica con selezione delle stesse popolazioni cellulari tipiche della risposta cellulo-mediata dell’uomo. Ciò che appare più interessante di questo modello è la possibilità di seguire la “storia istopatologica” dell’infezione con la relativa caratterizzazione dei fattori umorali e cellulari che la identificano aprendo

nuove vie per lo studio delle patologie *H. pylori*-indotte e dei presidi immunizzanti da usare anche in campo umano.

Bibliografia

- 1) Rossi G, Fortuna D, Sozzi S, Renzoni G, Taccini E: Histopathological and immunohistochemical staging of *Helicobacter pylori* lesions induced in experimentally infected xenobiotic dogs. Proc.15th Meet. Europ. Soc. Vet. Pathol, 90, 1997.
- 2) Crabtree JE, Peichl P, Wyatt JJ, Stachl U, Lindley IJ: Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *H. pylori* infection. Scand J Immunol 37: 65-70, 1993.
- 3) Ando T, Kusugami K, Ohsuga M, Shinoda M, Sakakibara M, Saito H, Fukatsu A, Ichiyama S, Ohta M: Interleukin-8 activity correlates with histological severity in *H. pylori*-associated antral gastritis. Am J Gastroenterol 91: 1150-1156, 1996.
- 4) Uemura N, Oomoto Y, Mukai T, Okamoto S, Yamaguchi S, Mashiba H, Taniyama K, Sasaki N, Sumii K, Haruma K, Kajihama G: Gastric corpus IL-8 concentration and neutrophil infiltration in duodenal ulcer patients. Aliment Pharmacol Ther 11: 793-800, 1997.
- 5) Genta RM, Hamner HW, Graham DY: Gastric lymphoid follicles in *H. pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. Hum Pathol 24: 577-583, 1993.
- 6) Owen DA: The morphology of gastritis. Yale J Biol Med 69: 51-60, 1996.
- 7) Fox JC, Batchelder M, Marini R, Yan L, Handt L, Li X, Chames B, Hayward J, Campbell J, Murphy JC: *Helicobacter pylori* induced gastritis in the domestic cat. Infect Immun 63: 2674-2681, 1995.
- 8) Handt LK, Fox JG, Stalis IH, Rufo R, Lee J, Lin J, Li X, Kleantous H: Characterization of feline *Helicobacter pylori* strains and associated gastritis in a colony of domestic cats. J Clin Microbiol 33: 2280-2289, 1995.
- 9) Radin MJ, Eaton KA, Krakowka S, Morgan DR, Lee A, Otto G, Fox J: *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. Infect Immun 58: 2606-2612, 1990.
- 10) Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J: *Helicobacter pylori*-specific tumor infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. J. Pathol. 178:122-127, 1996.
- 11) Parsonnet JS, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelstein JH, Friedman GD: *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med 330: 1267-1271, 1994.

12) Mohammadi M, Czinn S, Redline R, Nedrud J: *Helicobacter* specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. J Immunol 156:4729-4738, 1996.

**La ricerca è stata realizzata con fondi di Ateneo*