

Il ruolo del microbiota intestinale nella patogenesi del linfoma intestinale a cellule t del gatto; effetto dell'integrazione alimentare con probiotici sul follow-up

Menicocci Cristina, DVM
cris.m.2018it@gmail.com

SUMMARY

THE ROLE OF INTESTINAL MICROBIOTA IN CAT T-CELL INTESTINAL LYMPHOMA; CONSEQUENCES ON THE FOLLOW-UP WITH THE PROBIOTIC ALIMENTARY INTEGRATION

Negli ultimi anni numerosi studi hanno avvalorato l'ipotesi che il microbiota intestinale sia una parte fondamentale sia per il normale funzionamento dell'apparato digerente, sia per un'adeguata e perfetta barriera di protezione contro neoplasia e malattie infiammatorie croniche. La disbiosi è quindi da annoverare tra le possibili cause di patologie gastrointestinali come per esempio nel linfoma. Le Tight Junction regolano la funzione di barriera. Un regolatore importante di questa barriera è il microbiota intestinale. Nel linfoma intestinale l'aumento della permeabilità delle giunzioni strette degli enterociti favorisce l'ingresso dal lume intestinale di peptidi non demoliti. Una volta lì si innescano risposte immunitarie che hanno come effetti l'autoimmunità, infiammazione della mucosa e la crescita di una disbiosi, peggiorando la prognosi della malattia. Possiamo ipotizzare che l'integrazione con probiotici determina la produzione da parte del microbiota di diversi meccanismi tra cui rafforzare la barriera intestinale influenzando la produzione di muco, avere un effetto trofico sulla crescita delle cellule epiteliali e alterare il PH. Questo studio confronta gatti sani, gatti affetti da linfoma trattati con chemioterapici e probiotici, e gatti trattati con chemioterapici ma senza l'utilizzo di probiotici arrivando alla conclusione che l'utilizzo dei probiotici in corso di terapia per il linfoma è utile, favorevole ed auspicabile.

KEY WORDS Linfoma, disbiosi, probiotici, zonulina, gatto

INTRODUZIONE

Il linfoma è la malattia più comune dei piccoli animali. Nel gatto è seguita da adencarcinoma e mastocitoma e il tratto gastrointestinale è il sito più comune per questa patologia. Per il gatto non esiste alcuna predisposizione di razza e ha un'incidenza maggiore nel maschio piuttosto che nella femmina. Il linfoma felino è classificato secondo il sito anatomico, il grado istologico e l'immunofenotipo. (Paolo Stefano Marcato, 2008). Dal punto di vista istologico il linfoma è diviso in linfocitico (low grade o a piccole cellule), linfoblastico (high grade o a grandi cellule) e un tipo intermedio. L'high grade ha un decorso più acuto, il primo invece più lento. Le statistiche inoltre rivelano che il low grade sia tre volte più frequente dell'high grade nel gatto. Il low grade è maggiormente presente nei gatti più vecchi e l'high grade in quelli più giovani. In

generale il low grade risponde meglio alla terapia ed ha tempi di sopravvivenza più lunghi rispetto agli altri. Il tempo medio di sopravvivenza è di 7-10 mesi nell'high grade e 19-29 mesi nel low grade. Il linfoma high grade è frequentemente associato al tumore delle cellule B e quello low grade a quello T. C'è una stretta correlazione tra immunofenotipizzazione e localizzazione neoplastica nel tubo gastroenterico: il linfoma a cellule B predomina nello stomaco e nel grosso intestino e il linfoma a cellule T è più comune nel piccolo intestino. (Vanessa Barrs and Julia Beatty, 2012). Si evidenzia dagli studi come il fenotipo T sia quello prevalente. (Withrow e MacEwen's, 2007). Questo lavoro si incentrerà sul linfoma low grade a cellule T. Il decorso clinico di questo tipo di linfoma è cronico, si ha una graduale perdita di peso, vomito, diarrea, diminuzione dell'appetito ma non

sempre questi segni clinici possono essere presenti. Attraverso l'esame obiettivo generale si possono occasionalmente riscontrare ispessimenti delle anse intestinali, è raro trovare delle vere e proprie masse e all'inizio può essere difficile differenziarlo dall'IBD se non si effettua un'analisi istologica.

Il metodo ottimale in caso di linfoma per ottenere diagnosi è l'analisi istologica tramite biopsia. La terapia con agenti chemioterapici sembra essere la miglior opzione (la chirurgia è consigliata solamente nei casi di ostruzione). Esistono diversi protocolli e il monitoraggio durante e dopo la loro somministrazione è fondamentale. Il protocollo maggiormente utilizzato è quello che prevede prednisone (Novosterol, Ceva salute animale) e clorambucile (Leukeram, Laboratorio farmaceutico milanese), (anche se questo dipende dalle singole strutture che effettuano protocolli chemioterapici).

Il prednisone può essere inizialmente somministrato a dosi di (2-3 mg/kg PO ogni 24 ore o in una dose standard di 5-10 mg per gatto al giorno, e poi ridurlo a 1-2 mg/kg/d una volta che si ha una solida remissione).

Il clorambucile è utilizzato in dosi di 2 mg/gatto PO ogni 48/72 ore o come bolo (20 mg/m² PO) ogni 2/3 settimane. Somministrata la prima dose di clorambucile se non ci sono effetti collaterali si procede all'aggiustamento e alla valutazione ad ogni somministrazione. (Christian Eriksson de Rezende, Suliman Al-Ghazlat, 2013).

Negli ultimi anni numerosi studi hanno avvalorato l'ipotesi che il microbiota intestinale sia una parte fondamentale sia per il normale funzionamento dell'apparato digerente ma anche un'adeguata e perfetta barriera di protezione contro neoplasia e malattie infiammatorie croniche. Il microbiota intestinale è l'insieme di tutti i microorganismi viventi che popolano il tratto gastrointestinale. Ogni animale ospita un profilo unico e individuale. La disbiosi è da annoverare tra le possibili cause di patologie gastroentericali. Una disbiosi accoppiata a fattori genetici e ambiente esterno può essere la causa della formazione di una neoplasia o di un'altra patologia gastroenterica grave come IBD. Il meccanismo con cui la disbiosi promuove la carcinogenesi è ancora sconosciuto, si pensa che il microbiota possa influenzare la carcinogenesi in due modi:

attraverso agenti genotossici (come la produzione di acido nitrico radicali liberi o altre sostanze simili che danneggiano il DNA) e attraverso mediatori metabolici. La produzione di acidi grassi volatili ma anche la regolazione dei toll-like receptore e delle citochine proinfiammatorie sono tutti esempi in cui il microbiota regola mediatori che possono inibire o incentivare la formazione del cancro. Da soli i batteri non sono

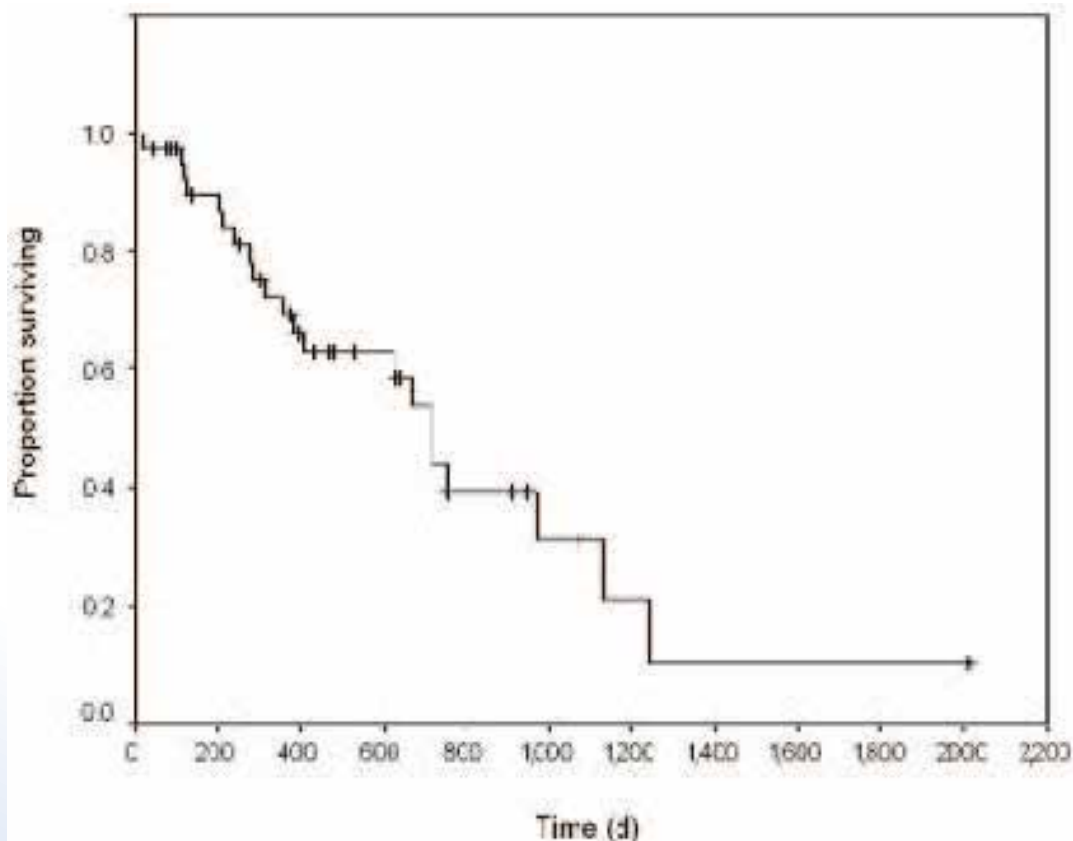
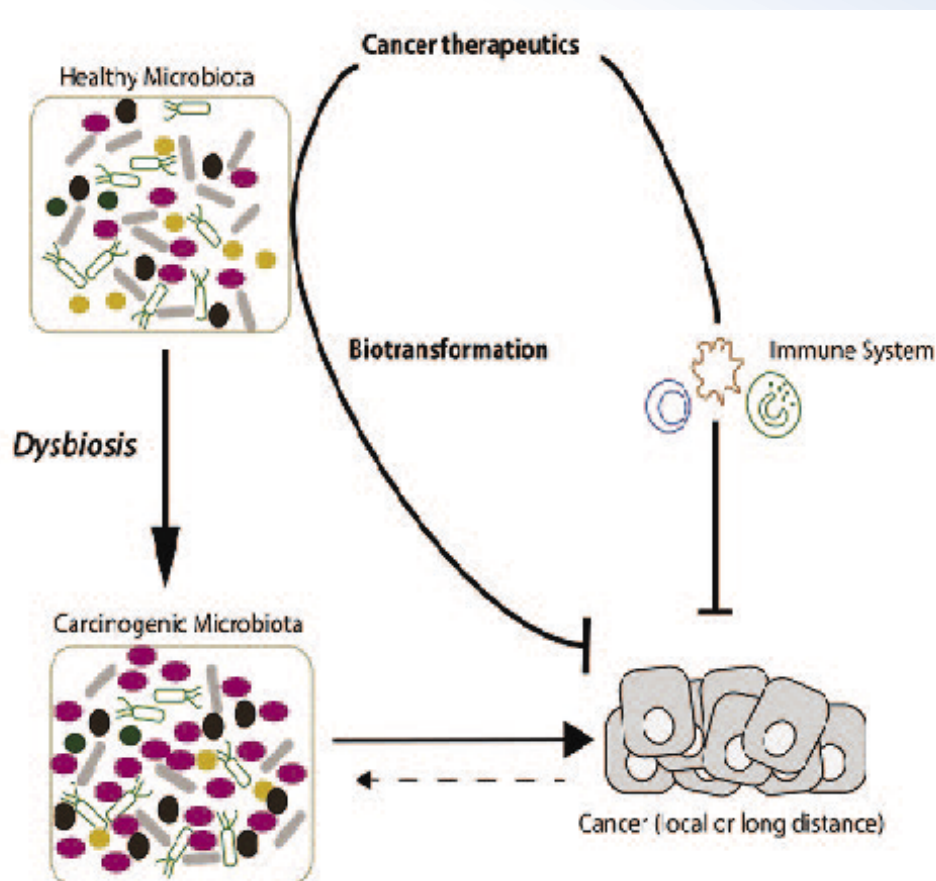


Grafico 1: curva di Kaplan Meier che mostra il tempo di sopravvivenza di 41 gatti con low grade linfoma trattati con prednisone e clorambucile. (Michael A. Kiselow et al, 2008).

Figura 1: il microbiota intestinale regola la carcinogenesi a vari livelli. La disbiosi aumenta il numero di batteri che incentivano la formazione di tumori e che possono avere un effetto locale o a lunga distanza. Un microbiota sano può biotrasformare una terapia antitumorale aumentando l'efficienza e diminuendo la tossicità. Inoltre, il microbiota può agire con il sistema immunitario per inibire il cancro. (Jillian L. Pope et al, 2016).



sufficienti per la carcinogenesi ma esso stesso può essere un incentivo al processo patologico. (Valeria Garsia-Castillo et al, 2016).

La popolazione microbica ha effetti sia sulla mucosa locale sia sulle cellule immunitarie sistemiche creando quindi un controllo in cui il sistema immunitario e il microbiota si regolano l'un l'altro. Le caratteristiche del microbiota comprendono una grande quantità di segnali e meccanismi che possono attivare il sistema immunitario incluso la trasformazione e l'alterazione genetica. (Maayan Levy et al, 2017). Come già accennato, come per gli altri tumori, nel linfoma il meccanismo con cui la disbiosi promuove la carcinogenesi è ancora sconosciuto. È stato suggerito che il cambio del microbiota porta a cambiamenti nella barriera mucosale, alterando l'espressione della differenziazione dei markers e l'insorgenza dell'infiammazione intestinale. Normalmente la barriera presenta sistemi che eliminano batteri invasivi e specifiche cellule controllano il numero e la locazione dei batteri e regolano il microbiota attraverso la secrezione di peptidi antimicrobici. Il microbiota inoltre mantiene il turnover cellulare epiteliale producendo mucina e producendo altre sostanze che sopprimono la crescita eccessiva del microbiota stesso. L'alterazione di questi meccanismi può indurre la carcinogenesi. (Antoaneta Belcheva et al, 2015). Per quanto riguarda

il sistema immunitario nell'animale sano c'è una anatomica separazione tra i batteri commensali e le cellule. Così la perdita della naturale barriera fisica (tight junctions, il muco ecc..) e anche l'abbassamento dei livelli delle difese antibatteriche determinano l'accesso di componenti cellulari (come i lipopolisaccaridi) o di microorganismi nella circolazione sistemica dove essi possono causare infiammazione. Questa perdita della barriera può risultare da difetti primari nei geni che codificano proteine essenziali per il mantenimento della funzione di barriera o secondariamente dovuto a infiammazione. Differenti cellule presentano recettori di riconoscimento che mediano l'interazione tra il sistema immunitario e il microbiota commensale come i Toll-Like receptor (TLR) e i NOD receptor. Queste strutture riconoscono molecole associate al microbiota come i lipopolisaccaridi, peptidoglicani ecc.. che scatenano un processo proinfiammatorio che coinvolge varie altre molecole tra cui le citochine. Il TLR induce un segnale di sopravvivenza cellulare mediante attivazione di specifiche proteine. I TLR inoltre possono indurre direttamente tumore attraverso l'in-

centivazione della proliferazione di agenti mitogeni (Valeria García-castillo et al, 2016). Il microbiota influenza direttamente e/o indirettamente le cellule immunitarie e incentiva la proliferazione linfocitaria che può portare a cancro e aberrazioni del DNA. L'infiammazione cronica quindi causata dalla malattia autoimmune è responsabile dell'aumento del rischio di linfoma. Nei pazienti con malattie autoimmuni si verifica una disregolazione e iperattività delle cellule B così come diminuzione del controllo delle cellule T che possono portare allo sviluppo di linfoma. Le condizioni autoimmunitarie, causate da un'infiammazione cronica guidata dalla diffusione dell'antigene o di quello che il sistema immunitario riconosce come antigene, inducono alla formazione del linfoma.

MATERIALI E METODI

Animali

Il nostro studio è stato effettuato su venti gatti padronali di differente razza ed età, tutti con una diagnosi di linfoma intestinale in accordo con i criteri pubblicati a livello internazionale (Jergens, 1992; Jergens, 1999). Tutti i gatti erano riferiti all'OVUD (Ospedale Veterinario Universitario Didattico) della Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria dell'Università di Camerino, per giungere ad una diagnosi di certezza data la lunga storia clinica di gastroenterite cronica. I criteri di inclusione dei gatti della popolazione di studio erano la ricorrenza dei segni clinici e l'assenza di qualsiasi terapia immunomodulante o a effetto immunosoppressore (somministrazione di corticosteroidi, metronidazolo, sulfasalazina) nel mese precedente il ricovero. In particolare i criteri che facevano propendere per la diagnosi di linfoma erano la persistenza dei segni gastrointestinali (con durata maggiore di tre settimane), la mancanza di una risposta alle terapie alimentari (adozione di dieta del commercio a base di proteine selezionate o a base di idrolisati proteici) o alle terapie sintomatiche (somministrazione di antiparassitari, antibiotici, anticolinergici e protettori della mucosa gastroenterica); nonché una diagnosi istopatologica di infiltrazione linfomatosa della mucosa intestinale del piccolo o del grosso intestino, in associazione o

meno con un quadro di flogosi cronica. Tutti i gatti venivano quindi curati e mantenuti in accordo con le linee ed i protocolli approvati dal Comitato Etico dell'Università di Camerino (Camerino University Institutional Animal Care and Use Committee). I parametri diagnostici di base effettuati nei gatti oggetto dello studio includevano inoltre un esame ematobiochimico completo, un esame delle urine, un esame diretto (a fresco) ed indiretto (previa flottazione) delle feci per escludere la presenza di nematelminti o di protozoi, ed eventuali esami ecografici e radiografici quando necessari. In alcuni casi venivano eseguiti altri test addizionali quali radiografie con mezzo di contrasto (solfato di bario), ecografia addominale, il test di serum trypsin-like immunoreactivity, e esami sierologici per la valutazione della presenza di vitamine, in particolare per la determinazione dei folati e della cobalamina, quando necessari. Altri criteri addizionali di inclusione dei gatti nel gruppo di studio era l'assenza di flogosi in altri distretti organici extra intestinali, esclusa sulla base delle indagini cliniche preliminari. Il gruppo di controllo, consisteva in 10 gatti adulti, di razza mista e di varia origine, liberi da qualsiasi segno di patologia gastrointestinale da almeno quattro mesi prima del ricovero, avvenuto per altre cause o per visite di controllo. Ogni gatto di controllo veniva definito "sano" in base all'assenza di segni clinici gastroenterici alla visita, e dopo un esame ematobiochimico ed urinario completo, esami coprologici multipli e negatività al test per FIV e FeLV. Questi gatti venivano utilizzati per la valutazione del microbioma, al fine di valutare la composizione della flora "normale" di gatti che vivono nell'area dell'Italia del centro – nord.

Disegno Sperimentale

Lo studio "pilota" è stato una valutazione di tipo "open-label" della durata di 90 giorni per testare l'efficacia dell'integrazione di un probiotico "multi-strain" del commercio (SIVOY®, Mendes S.r.l., Lugano, CH) associato alla chemioterapia orale a base di Clorambucile, versus la semplice chemioterapia orale a base sempre di Clorambucile ed eventualmente corticosteroidi per il trattamento del linfoma.

I gatti arruolati per fare il protocollo con aggiunta di probiotici, ricevevano giornalmente una media di 450 miliardi di batteri liofilizzati per 60 gg. Il dosaggio dei probiotici veniva calcolato sulla base di studi precedentemente fatti sull'utilizzo di questo prodotto, ma non ancora pubblicati. I proprietari dei gatti inclusi in questo studio hanno partecipato previo rilascio di opportuno consenso informato. I gatti con linfoma (GL) venivano screenati una settimana prima dell'inizio dello studio e venivano assegnati in modo randomizzato o al protocollo con Clorambucile (GL-P/C) e probiotici (10 gatti), oppure al gruppo solo Clorambucile e corticosteroidi (prednisone al dosaggio di 1mg/kg peso vivo per giorno) (GL-C) (10 gatti). Le manifestazioni cliniche e il grado di attività della malattia venivano valutati in base al FCEAI score al momento dell'inizio dello studio (T0) e dopo 90 giorni (T1), ovvero 30 giorni dopo aver terminato il trattamento con i probiotici. A questo punto, dopo aver valutato il FCEAI score si procedeva al campionamento delle feci poi immediatamente congelate a -80°C in attesa di essere analizzate per la valutazione del microbiota intestinale residente.

Campionamento tessutale

Dopo l'arruolamento, si procedeva ad un esame endoscopico gastro-duodenale e colico dei gatti ammalati, con il campionamento di biopsie mucosali multiple (da 10 a 15 campioni biotici) per le indagini di tipo istopatologico confermativo. Dodici gatti presentavano segni clinici tipici di interessamento del tratto gastrointestinale superiore (vomito, diarrea del piccolo intestino, anoressia e forte perdita di peso), ricevendo una esofago-gastro-duodenoscopia senza colonscopia dal momento che i segni erano chiaramente indicativi di una patologia del tratto GI anteriore. Solo 8 gatti erano sottoposti ad una endoscopia colica a seguito della manifestazione di enterocolite (segni gastrointestinali associati a tenesmo, ematochezia, feci mucoidi/diarrea colica con defecazioni frequenti). Per ragioni etiche non si effettuavano endoscopie e quindi campionamenti biotici sui gatti della popolazione di controllo "sani". Come tessuti di controllo di gatti non ammalati, si prendevano campioni

istologici d'archivio derivanti dall'istoteca della Scuola di BMV. I tessuti prelevati con la biopsia venivano immediatamente fissati in formalina tamponata al 10% per un massimo di 3 ore, poi risciacquati più volte in PBS sterile, quindi disidratati ed inclusi in paraffina, e poi utilizzati per realizzare sezioni istologiche seriali di 3µm di spessore, per lo studio dei parametri morfologici ed immunostochimici. Tessuti d'archivio di intestino e colon di gatti deceduti e non presentanti alterazioni intestinali venivano mantenuti come "controlli sani" per lo studio istopatologico. Questi tessuti derivavano da tre gatti maschi soppressi presso l'OVUD della Scuola BMV, poiché arrivati in condizioni disperate (due soggetti) dopo un incidente, o ricoverati (1 soggetto) con carcinoma squamocellulare insorto a livello della lingua ed esteso al cavo orale. I tessuti dei tre gatti, ottenuti subito dopo la morte per eutanasia (Gatti eutanatizzati di controllo GEC) erano stati processati come gli altri. L'età dei tre gatti GEC variava da 9 a 16 anni e l'esame delle feci, effettuato subito dopo la morte, in sede autoptica, era apparso negativo per parassiti. L'esame istopatologico delle biopsie prelevate a tutto spessore dei differenti tratti intestinali dei tre gatti, rilevava una totale negatività della mucosa intestinale – colica che appariva in stato parafisiologico. Tutti questi campioni biotici venivano quindi utilizzati per effettuare un esame dell'espressione di alcune molecole facenti parte dei complessi giunzionali apicali degli enterociti (Complessi Giunzionali Apicali, CGA).

L'esame istopatologico di tutte le biopsie veniva effettuato graduando ogni campione biotico tramite un "lesions severity score" utilizzando sistemi standardizzati di grading istologico descritti precedentemente da altri autori (Allenspach, 2007; German, 2000; Jergens, 1999; Jergens, 2003). Le biopsie venivano lette dai patologi "in cieco", senza conoscere la storia clinica del paziente o le osservazioni/impressioni endoscopiche effettuate dal clinico endoscopista.

Criteri istopatologici simili a quelli da noi utilizzati nella lettura dei preparati sono stati approvati anche nelle linee guida WSAVA (World Small Animal Veterinary Association)

del "Gastrointestinal standardization group" per la diagnosi delle flogosi gastrointestinali del gatto e del cane (Day, 2008).

Studio Immunoistochimico

Le sezioni seriali derivanti dai blocchetti paraffinati si sono utilizzate anche per lo studio IHC. Per questa finalità, le sezioni una volta sparaffinate e portate all'acqua, venivano trattate con H₂O₂ al 3% per inibire le perossidasi endogene per 5 minuti. Le sezioni erano quindi lavate in acqua distillata e poste in una soluzione di smascheramento antigenico come segue: Tampone Citrato a pH6.0, EDTA a pH8.0 (per lo studio dei CD3 e dei CD79a, nonché CD21 e CD18), ed infine con uso di tampone Tris-EDTA, 0.01 M, pH 9.0 per la valutazione dell'espressione di claudina 2/occludina, E-cadherin e Zonulina), in accordo con i datasheets degli anticorpi. I vetrini venivano mantenuti per questa metodica in una autoclave a elevata temperatura (Black & Decker, Towson, MD) per 20 minuti. Dopo una inibizione dei legami aspecifici delle immunoglobuline tramite incubazione delle sezioni con uno specifico agente bloccante le proteine endogene (Dako, Carpinteria, CA) applicato per 10' prima dell'incubazione dell'anticorpo primario, i vetrini sono stati incubati overnight in camera umida con i seguenti anticorpi primari: monoclonal (mAb) rat anti-human CD3 (Serotec, clone MCA1477, diluted 1:50), mAb anti-human CD79a antibodies (eBioscience, San Diego, diluted 1:400), mAb mouse anti-CD21 (Serotec, diluted 1:25). I cloni degli anticorpi venivano scelti sulla base di indicazioni date dalla casa produttrice di cross-reattività con la specie felina.

Per lo studio delle giunzioni serrate, gli anticorpi policlonali rabbit anti-claudina-2 (PAD: MH44) e anti-occludina (PAD: Z-T22) erano acquistati da Invitrogen, Ltd. (Paisley, UK), mentre l'anticorpo monoclonal mouse anti-E-cadherin IgG2a (clone: 36) era stato comprato insieme all'anticorpo monoclonale mouse anti-Zonulina IgG da BD Biosciences (Oxford, UK).

Per la valutazione dell'immunomarcatura specifica si è utilizzato un Sistema di rilevamento streptavidin-immunoperoxidase (Dako). L'immunoreazione è stata visualizzata

nei tessuti utilizzando 3,3'-diaminobenzidine (DAB) come substrato (Vector, Burlingame, UK). Le sezioni istologiche sono state quindi contrastate tramite uso di ematossilina di Mayer. I controlli immunosistochimici positivi e negativi consistevano in tessuti dove si procedeva operando l'omissione dell'anticorpo primario. I controlli negativi per l'IHC erano sezioni dove, dopo lo smascheramento dell'antigene per 20 minuti e dopo il blocco delle proteine per 10 minuti, si rimpiazzava l'anticorpo primario con un tampone semplice per l'incubazione overnight. I campioni invece utilizzati come controlli positivi erano sezioni istologiche di milza e tonsille di gatto per lo studio degli anticorpi specifici per i CD3, CD79a e CD21. Per gli anticorpi specifici per claudina/occludina, zonulina e per E-cadherina, le sezioni controllo positive consistevano in sezioni di polmone e rene di gatto.

Per valutare l'espressione delle molecole dei complessi giunzionali (claudina-2, occludina, zonulina ed E-cadherina), le sezioni sono state valutate a $\times 200$ e $\times 630$ (oil immersion) ingrandimenti al fine di identificare le aree di forte marcatura e di corretto orientamento del campione. L'immonocolorazione è stata valutata lungo tutta la lunghezza di molteplici villi e cripte coliche andando a valutare solo aree con epitelio ancora intatto. Circa il grado della marcatura lungo l'epitelio tappezzante i villi e le cripte è utilizzata questa scala: assente (-), lieve (+), moderato (++), o forte (+++), e la localizzazione e la distribuzione del cromogeno era nota.

Data analysis (Statistica)

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate usando un software commerciale (Prism 5.00, Graphpad Prism, La Jolla, CA). I dati sono stati valutati per la loro "normalità" usando il test di Kolmogorov-Smirnov. Le differenze a livello di baseline (T0) negli scores istologici per la valutazione dell'espressione di cellule CD3, CD79a e CD21 positive, e l'andamento degli indici di clinical activity (FCEAI) tra il gruppo Sivoy ed il gruppo con solo terapia, sono stati ottenuti confrontando il gruppo Sivoy e il gruppo con sola chemio, utilizzando il t-tests o il test Mann-Whitney dove era appropriato.

Le differenze in ogni gruppo di trattamento vengono confrontate al tempo T0 e T1 usando t-test accoppiati o Wilcoxon test in coppia, dove sia opportuno. La significatività statistica era fissata a $p < 0.05$.

Sul test in coppia. I P-values risultanti erano corretti per comparazioni multiple su ogni livello filogenetico usando il Benjamini & Hochberg's False Discovery Rate, e $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Tutti i parametri valutati non sono significativamente differenti al tempo T0 tra il gruppo SIVOY (GL-P/C) e il gruppo con solo trattamento chemioterapico (GL-C) eccetto per i valori FCEAI. Il valore FCEAI era significativamente più alto al tempo T0 nel gruppo GL-C (mediana 9, intervallo 7-13) comparato con il gruppo GL-P/C (mediana 7, intervallo 5-10). Comunque, entrambi i gruppi presentavano una generale moderata/severa attività della malattia globale media. I diversi parametri valutati cambiano significativamente dopo il trattamento in entrambi i gruppi considerati. Nei cani GL-P/C il grado istologico diminuisce tra il T0 e il T1 da una mediana (intervallo) 11.5 (7-14) a 4 (3-7; $p < 0.0001$). Il valore FCEAI diminuisce da una mediana (intervallo) 7 (5-10) a 0 (0-2; $p = 0.0057$). L'infiltrazione mucosale con linfociti CD3+ T diminuisce da una media ($\pm$ SD) 3318 (± 447.1) a 1204 (± 240.4 ; $p = 0.0006$). Inoltre, l'infiltrazione con CD79a aumenta da 35.4 (± 30.3) to 791.8 (± 771.9 ; $p = 0.002$) mentre l'infiltrazione con cellule CD21+ aumentano da 26.9 (± 26.9) a 353.6 (± 175.1 ; $p = 0.002$).

Risultati simili sono stati ottenuti nel gruppo di gatti con linfoma trattati con solo clorambucile GL-C. In sintesi il risultato istologico diminuisce tra il periodo T0 e il T1 da una media (intervallo) 9 (3-14) a 3 (0-9; $p = 0.0008$); il risultato FCEAI diminuisce da una media (intervallo) 9 (7-13) a 0 (0-3; $p = 0.0056$); l'infiltrazione con i linfociti CD3+T diminuisce da un significativo ($\pm$ SD) 3427 (± 1813) a 845 (± 849 ; $p = 0.0098$); l'infiltrazione con CD79a aumenta da 32.6 (± 21.8) a 136.7 (± 122.0 ; $p = 0.0137$); e l'infiltrazione con cellule CD21+ è aumentato

da 11.1 (± 9.5) a 51.5 (± 32.2 ; $p = 0.0066$) in gatti con linfoma intestinale. Da notare che questi risultati potrebbero essere riassunti in una tabella che va contro la trattazione vera e propria ma un reviewer potrebbe richiedere questo sforzo per ridurre la lunghezza dello studio.

L'espressione delle proteine AJC analizzate sono rintracciate nella mucosa intestinale di tutti i gatti di controllo eutanasiati GEC e i gatti GL-P/C trattati con SIVOY; Invece qualche differenza è stata osservata in gatti trattati solo con clorambucile GL-C. L'espressione della zonulina e dell'occludina era più intensa nelle cellule epiteliali AJC, con una espressione più debole lungo la membrana basolaterale, e sembra essere uniformemente espressa lungo l'epitelio dei GEC e dei GL-P/C nel piccolo e grande intestino. Al contrario un'espressione debole o assente è osservata nell'epitelio luminale e in qualche ghiandola intestinale del piccolo intestino del gruppo GL-C.

Non si evidenziavano differenze sostanziali o nell'intensità della colorazione per E-caderina tra gatti sani e malati; l'intensità generale della colorazione per E-caderina diminuisce dall'epitelio luminale fino alle cripte distali. Nell'epitelio luminale, la banda era uniforme lungo tutta la lunghezza delle giunzioni intracellulari, con un'espressione che diventa polarizzata verso le AJC nelle cripte e ghiandole distali. La marcatura specifica per E-caderina era ristretta alle AJC e nelle membrane basolaterali delle cellule epiteliali intestinali, con una piccola evidenziazione di specifiche bande fuori dall'epitelio. Nei gruppi GEC e GL-P/C, la claudina-2 è stata facilmente riscontrabile nell'epitelio duodenale e nelle ghiandole e nell'epitelio delle cripte del colon, diminuendo di intensità dalle cripte distali a quelle prossimali e diventando a malapena rintracciabili sulla superficie luminale del colon. La banda di claudina-a era ristretta alle cellule epiteliali AJC con qualche puntato basolaterale. Comunque, l'espressione della claudina-2 era aumentata nelle cripte prossimali e nell'epitelio luminale in tutti i cani GL-C, e è stata osservata anche qualche espressione citoplasmatica sporadica.

Riassunto delle statistiche per valutare i marker

	Sivoy GL-P/C		GL-C		controllo	
	T0	T1	T0	T1	-	
Valori istologici	11.5 (7-14)	4 (3-7)	9 (3-14)	3 (0-9)	—	P<0.0001*
Valori FCEAI	7 (5-10)	0 (0-2)	9 (7-13)	0 (0-3)	—	P<0.0001*
Cellule CD3 ⁺	3318 (±447.1)	1204 (±240.4)	3427 (±1813)	845 (±849)	—	P<0.0001*
Cellule CD21 ⁺	26.9 (±26.9)	353.6 (±175.1)	11.1 (±9.5)	51.5 (±32.2)	—	P=0.0001**
Cellule CD79a ⁺	35.4 (±30.3)	791.8 (±771.9)	32.6 (±21.8)	136.7 (±122)	—	P=0.0043*
Zonulina [†]	—	4523 (±1366)	—	814 (±387)	6511 (±1239)	P<0.0001
E-caderina [†]	—	4767 (±2288)	—	4735 (±1319)	4877 (±971)	P=0.9467
Occludina [†]	—	4523 (±1366)	—	814 (±387)	6511 (±1239)	P<0.0001
Claudina-2 [†] (SI)	—	4274 (±1201)	—	4421 (±1293)	4994 (±1183)	P=0.7944
Claudina-2 [†] (LI)	—	525 (±264)	—	5771 (±1588)	680 (±305)	P<0.0001

FCEAI= Feline chronic enteropathy activity index (attività infiammatoria).

Valore istologico= L'esame istopatologico di tutte le biopsie veniva effettuato graduando ogni campioni bioptico tramite un "lesions severity score" utilizzando sistemi standardizzati di grading istologico.

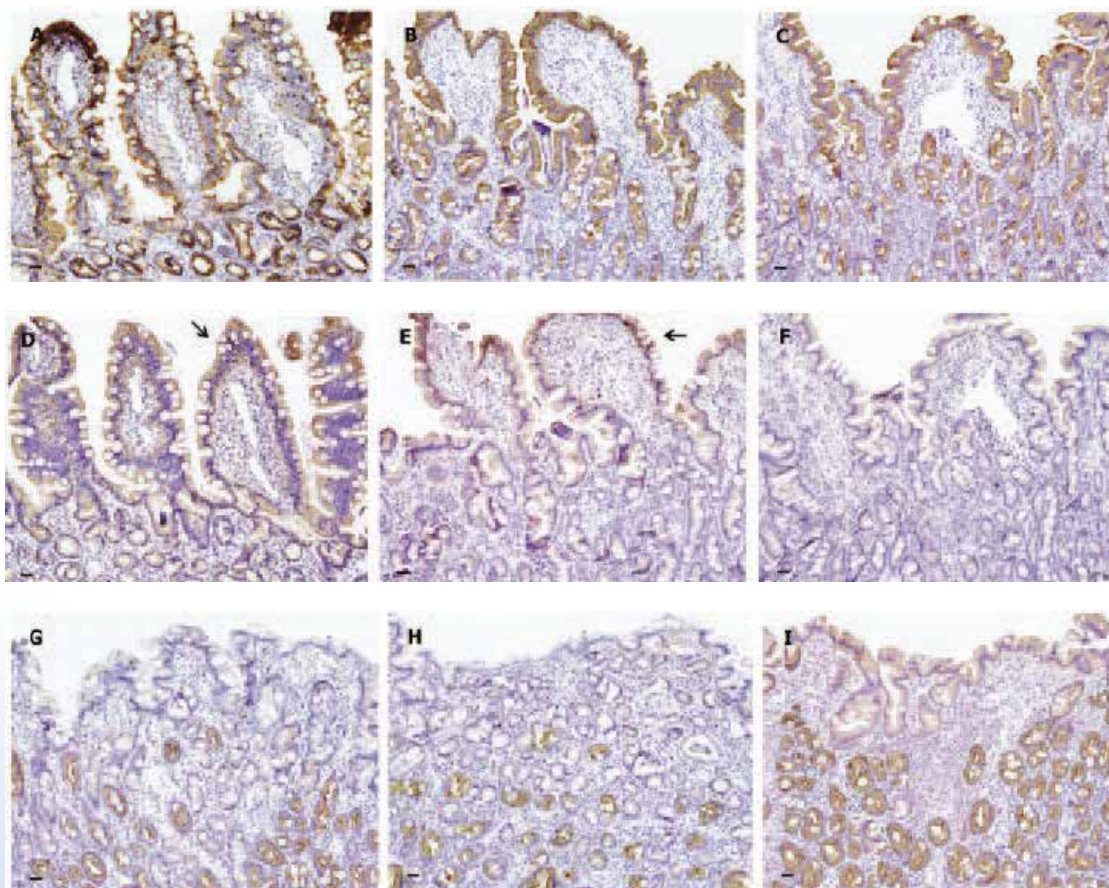
I dati numerici sono espressi come mediana (intervallo) per l'istologia e FCEAI e come media (± SD) per i risultati rimanenti.

*differenze significative tra T0 e T1 in entrambi i gruppi trattati.

**differenti significative tra T0 e T1 solo per il gruppo SIVOY.

[†]cellule per 62,500 μm².

Lo studio immunoistochimico



Distribuzione e intensità della marcatura per la E-Caderina nella mucosa normale (A) e nei campioni con linfoma (B e C).

Marcatura specifica per Zonulina e Occludina nei gatti del gruppo Controllo (D) e in quelli trattati con SIVOY+Clorambucile (E); e solo con Clorambucile (F).

Campioni di colon prelevati da gatti sani (G), da gatti trattati con Cloramb+Sivoy (H) e da quelli trattati solo con Clorambucile (I) per lo studio della claudina-2.

DISCUSSIONE

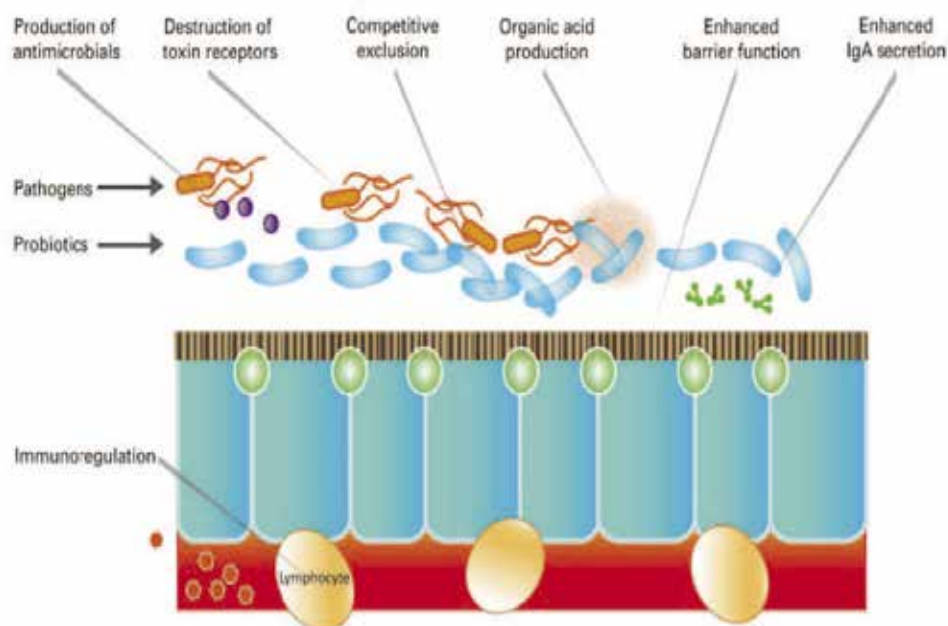
Dai risultati si evince che al tempo T0 gli indici su cui ci siamo soffermati (severità delle lesioni istologiche, attività infiammatoria e numerosità e tipologia delle cellule infiammatorie stesse), non erano differenti tra il gruppo trattato con probiotici e quello con soli chemioterapici tranne che per l'attività infiammatoria cronica dove sembra leggermente minore nel gruppo clorambucile+Sivoy. Al tempo T1 le diversità tra i due gruppi aumentano sensibilmente con un notevole miglioramento di tutti i valori presi in considerazione nel gruppo trattato con probiotici. Una delle conseguenze della diminuzione delle cellule neoplastiche è il miglioramento clinico della malattia. I probiotici attuano un'azione diretta e indiretta al fine di migliorare la malattia.

Alcuni batteri regolano lo sviluppo della barriera intestinale e anche le sue funzioni. Studi hanno mostrato che alcuni batteri come *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* aumentano la sopravvivenza cellulare epiteliale intestinale inibendo l'attivazione delle cellule proapoptotiche associate a batteri patogeni. Il microbiota commensale è anche coinvolto nel mantenimento della barriera attraverso la traslocazione delle proteine delle Tight Junctions e una up-regulation di geni coinvolti nel mantenimento dei desmosomi. Inoltre, i batteri commensali regolano lo sviluppo dell'architettura vascolare del villo. La superficie degli enterociti può riconoscere i prodotti batterici attraverso un gruppo di recettori chiamati TLR e ognuno di questi, come già accennato, riconosce un prodotto batterico specifico. La mucosa intestinale è composta da meccanismi non specifici come la motilità intestinale, secrezione mucosale, acidi gastrici, enzimi e anche un sistema immunitario tale da prevenire il transito di patogeni attraverso la barriera. Una riduzione o un'anormale colonizzazione durante il primo mese di vita provoca una maturazione postnatale della barriera intestinale con un'alterata permeabilità che facilita l'invasione di patogeni e sostanze estranee. Una colonizzazione microbica anormale potrebbe portare a infiammazione e aggravare la situazione di permeabilità. (Antonio Di Mauro

et al, 2013). Alcuni batteri commensali quindi modulano l'integrità della barriera epiteliale intestinale attraverso effetti antiinfiammatori e up-regolazione delle proteine delle Tight Junctions. (Carina-Shianya Alvarez et al, 2016). Il microbiota commensale è una parte integrante della barriera intestinale che protegge l'ospite da patogeni invasivi. Tra i meccanismi possiamo annoverare la competizione per l'ossigeno, i nutrienti, i siti mucosali di adesione e la creazione di un ambiente non adatto alla sopravvivenza dei batteri residenti (secrezione di sostanze antimicrobiche, alterazione del PH, produzione dell'idrogeno sulfide ecc..). Alcune sostanze prodotte dal microbiota sono molto importanti. La deidrossilazione degli acidi grassi dovuti ad alterazione dell'assorbimento dei grassi, determina un'alterazione della barriera intestinale con un aumento della permeabilità, distruzione degli enzimi dell'orletto a spazzola e dei trasportatori proteici epiteliali e la competizione per i substrati che portano a un malassorbimento dei nutrienti e delle vitamine. (J. S. Suchodolski, 2014). La disbiosi causa una disfunzione della barriera epiteliale intestinale che determina l'induzione o l'aggravamento dell'infiammazione. Infatti, i batteri inducono l'espressione di un gene nelle cellule epiteliali intestinali aumentando la permeabilità epiteliale. La distruzione della barriera epiteliale rafforza la risposta infiammatoria attraverso l'attivazione del sistema immunitario mucosale e quindi incrementando il rischio di IBD e malattie autoimmuni. Quindi terapie basate sul microbiota stesso possono risolvere o migliorare la permeabilità intestinale. (Kazuaki Nakata et al, 2017). I probiotici possono inibire alcune specie batteriche come *Bacteroides*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, e *Enterobacter* (che aderiscono all'epitelio intestinale e rimpiazzano i batteri commensali), inibendone la crescita e l'adesione alla mucosa. Un altro importante meccanismo è la produzione da parte delle specie probiotiche di metaboliti immunomodulatori. Questi possono agire attraverso la formazione di biofilm che sopprimono la produzione di tumor-necrosis-factor (TNF- α) e inoltre secernono metaboliti che hanno effetti benefici come la reuterina. Alcuni batteri

probiotici possono anche produrre varie sostanze antimicrobiche come per esempio il butirrato, lattato e l'acetato. Questi acidi grassi a catena corta hanno effetti immunomodulatori e possono servire come postbiotici e la loro somministrazione protegge l'ospite da batteri patogeni. Un altro meccanismo di alcuni batteri probiotici è quello di rafforzare la barriera intestinale. Il *Lactobacillus Paracasei* induce la produzione di occludina che è una proteina delle

Tight Junctions e quindi aumentano la stabilità delle giunzioni stesse e della barriera intestinale. (Jan S. Suchodolski e Albert E. Jersens, 2016). Il *Lactobacillus Acidophilus* induce effetti immunomodulatori e determina un equilibrio batterico gastrointestinale (GI), inoltre stimola l'appetito del gatto e la crescita nei cuccioli. L'effetto immunomodulatore consiste nella diminuzione della popolazione linfocitaria e un aumento degli eosinofili e un aumento dei fagociti periferici. Si notano anche piccoli cambiamenti nell'attività fagocitica dei granulociti e monociti. Effetti sulla salute in generale sono stati osservati nei gatti la cui dieta è stata incrementata con *L. Acidophilus* con una diminuzione di endotossine durante il trattamento con probiotici e un'aumentata resistenza alla lisi osmotica dei globuli rossi. La bassa concentrazione di endotossine determina un miglioramento della barriera intestinale e una diminuzione della possibilità di traslocazione di agenti patogeni. (Zoe V. Marshall-Jones et al, 2005). Altri meccanismi inducono una secrezione di muco o l'inibizione di citochine che inducono apoptosi. Altri recettori di riconoscimento importante sono i NOD. L'attivazione dei NOD dai batteri peptidoglicani determina segnali simili a quelli del TLR. Inoltre i probiotici determinano un up o down-regulation su vari geni che controllano la trascrizione di RNA, sintesi proteica di proteine di trasporto, di



Meccanismo dell'attività probiotica. (Jan S. Suchodolski e Albert E. Jersens, 2016).

adesione cellulare di proliferazione cellulare ecc.. Inoltre, questa up-regulation coinvolge anche la modulazione della crescita cellulare, sviluppo cellulare e metabolismo. I geni dell'ospite sono influenzati sia dalle specie batteriche sia dagli stessi metaboliti batterici. I probiotici influenzano anche la numerosità del microbiota. Inoltre, interagiscono con i batteri commensali con effetti benefici, per esempio possono aiutare a metabolizzare nutrienti della dieta rilasciando metaboliti che incentivano altri batteri a crescere. Inoltre, possono anche incentivare la crescita di alcune specie batteriche attraverso la competizione sull'assunzione di specifici nutrienti, con la produzione di antimicrobici e con la stimolazione del sistema immunitario intestinale. (Jan S. Suchodolski e Albert E. Jersens, 2016). Questi batteri stimolano solo una moderata espressione di alcune molecole, incentivano una bassa produzione di Tumoral Grow Factor (TGF) e eliminano la produzione di interleuchine. I probiotici possono proteggere contro le lesioni dei patogeni e sull'infiammazione modulando l'equilibrio tra produzione di citochine proinfiammatorie e antiinfiammatorie, hanno anche un effetto trofico sull'immunità della mucosa e sulla crescita delle cellule epiteliali. (Stephan C Bischoff et al, 2016). Quindi molteplici spiegazioni sono state date per spiegare gli effetti benefici dei probiotici sull'infiammazione intestinale: soppressione

dell'infiltrazione dei batteri patogeni, accrescimento dei meccanismi di difesa della barriera intestinale e attività immunomodulatoria. Per quanto riguarda la soppressione di batteri patogeni i probiotici possono diminuire il PH attraverso la produzione di acidi grassi a catena corta, secrezione di proteine battericide e concorrenza per l'adesione ai siti di legame. I probiotici quindi possono agire con varie strategie sul tumore. Avendo un miglioramento dell'infiammazione cronica, delle lesioni istopatologiche la sintomatologia clinica migliora. Questo è un dato molto importante anche per il proprietario che deve gestire l'iter terapeutico prolungato in casa per esempio.

La disbiosi può essere annoverata tra le cause della formazione della neoplasia. L'effetto contrario quindi, cioè il ristabilimento di una microflora batterica normale non può che portare conseguenze positive sull'ospite.

Le cellule neoplastiche a T1 presentano minori anomalie. L'infiltrazione infiammatoria neoplastica determinata dalle cellule CD3+ diminuisce. Essendo un linfoma a cellule T e verificatosi una diminuzione di questa popolazione linfocitaria, la malattia migliora notevolmente.

I probiotici, come già accennato prima, hanno un effetto immunomodulatore attraverso l'inibizione di meccanismi a cascata che portano all'attivazione delle cellule infiammatorie. Con l'azione dei probiotici, quindi, si attenua anche la popolazione di cellule T neoplastiche che secernono citochine anomale aggravando e complicando la malattia. Detto questo quindi, una diminuzione dei linfociti T maligni determina una diminuzione anche dei segnali alterati che potrebbero perpetuare e/o aggravare la malattia. Le cellule B che presentano il complesso CD79a e CD21+, aumentano. L'immunità umorale quindi viene stimolata ed aumentata.

C'è da notare inoltre che i valori raggiunti al tempo T1 del gruppo di gatti trattato con chemioterapici e probiotici assomigliano molto a quello dei gatti eutanasiati di controllo sani. Quindi i valori migliorano e la loro qualità della vita migliora nettamente e si pensa quindi che anche la longevità dei gatti possa aumentare vista la breve sopravvivenza che

ad oggi determina questo tipo di neoplasia. Le Tight Junctions (TJ) sono la parte principale del complesso giunzionale che è composto da proteine transmembrana tra cui la claudina, la occludina che connettono le proteine transmembrana collegate alle TJ con il citoscheletro. (Tim Vanuytsel et al, 2013). Queste regolano la permeabilità. Alcuni batteri commensali modulano l'integrità della barriera epiteliale intestinale attraverso effetti antiinfiammatori e up-regulation sulla distribuzione delle proteine delle TJ stesse. (Carina-Shianya Alvarez et al, 2016). Le TJ sono dinamiche e si adattano rapidamente ai vari cambiamenti anche in circostanze patologiche, infatti coordinano una risposta rapida alle sollecitazioni e questo richiede la presenza di un complesso sistema regolatorio che costituisce la sua rete di multiproteine. La zonulina è una proteina di adesione intercellulare che modula le giunzioni strette degli enterociti; la forma mutata di tale proteina si lega a uno specifico recettore sull'epitelio intestinale e innesca una cascata di reazioni biochimiche che determinano riduzione dell'adesione tra enterociti adiacenti e aumento della permeabilità della barriera intestinale (leaky-gut syndrome). Di conseguenza alcune molecole e/o sostanze che in condizioni fisiologiche verrebbero confinate sul versante luminale dell'epitelio intestinale, riescono ad attraversarlo scatenando una serie di reazioni auto-immunitarie nel tessuto. I livelli sierici di zonulina per esempio possono essere considerati un marker dell'integrità della barriera intestinale in molte malattie infiammatorie e tumorali (Alessio Fasano, 2011). Inoltre, una sovraespressione dell'allele che codifica la zonulina è correlata a un aumento del rischio di sviluppare malattie infiammatorie. (Alessio Fasano, 2012). Nel linfoma intestinale l'aumento della permeabilità delle giunzioni strette dell'epitelio intestinale ("leaky gut") favorisce l'ingresso dal lume intestinale di peptidi non demoliti. Una volta lì, questi peptidi vengono presentati alle cellule T CD4+ dalle cellule presentanti l'antigene (APCs). Quindi si innescano risposte immunitarie di tipo Th1 e Th2 che hanno come effetti l'infiammazione della mucosa e la crescita di un microbiota sfavorevole, peggiorando la prognosi del

linfoma. Per quanto riguarda le proteine del complesso giunzionale apicale, dallo studio emerge un notevole aumento dei valori della zonulina e dell'occludina nei soggetti trattati con probiotici e chemioterapici rispetto al gruppo trattato solo con chemioterapici simile a quello riscontrato nei soggetti sani.

La marcatura specifica per Zonulina e Occludina è più intensa a livello delle cellule epiteliali che coprono i villi nei gatti del gruppo Controllo (D) e dei trattati con SIVOY+Clorambucile (E); mentre una leggera e/o assente espressione è osservabile a livello di epitelio e di ghiandole del piccolo intestino dei gatti trattati solo con Clorambucile (F).

Il risultato dell'espressione della zonulina tissutale nei soggetti trattati con probiotici rispetto a quelli trattati solo con i chemioterapici emerge dal fatto che i probiotici attraverso la loro azione possono proteggere l'integrità della barriera impedendo il danno alla barriera stessa.

Per quanto riguarda invece la Claudina abbiamo riscontrato nei campioni di colon prelevati dai gatti sani (G) e dai gatti trattati con Cloramb+Sivoy (H) l'espressione della

proteina è facilmente osservabile e presente nell'epitelio delle cripte del colon pur decrescendo dalla porzione più prossimale a quella più distale delle cripte; divenendo appena osservabile sull'epitelio luminale. C'è da dire che l'espressione della claudina-2 è molto aumentata nei gatti trattati solo con Clorambucile (I). Mentre i valori ottenuti nei gatti del gruppo Sivoy sono molto simili a quelli degli animali sani. Come anche altri studi hanno confermato, in corso di infiammazione cronica la Claudina tende a diminuire, mentre, in quella acuta aumenta. Come anche altri studi hanno confermato, in corso di infiammazione cronica la Claudina tende a aumentare e un iter simile si sviluppa per altre malattie gastroenteriche come IBD, tumore colonrettale e celiachia. (Zhe Lu, Lei Ding et al, 2013). Quindi anche qui viene messo in risalto l'azione positiva dei probiotici. Visto che la disbiosi è una delle cause delle principali malattie gastrointestinali (ed il linfoma è a pieno titolo una di queste), l'inserimento di probiotici nel protocollo terapeutico è sicuramente da prendere in considerazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Antoaneta Belcheva, Thergiorry Irrazabal and Alberto Martin, 2015, Gut microbial metabolism and colon cancer: Can manipulations of the microbiota be useful in the management of gastrointestinal health?
2. Antonio Di Mauro, Josef Neu, Giuseppe Riezzo, Francesco Raimondi, Domenico Martinelli, Ruggiero Francavilla e Flavia Indrio, 2013, Gastrointestinal function development and microbiota.
3. Alessio Fasano, 2012, Intestinal Permeability and its Regulation by Zonulin: Diagnostic and Therapeutic Implications.
4. Alessio Fasano, 2012, Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer.
5. Carina-Shianya Alvarez, Josefa Badia, Manel Bosch, Rosa Giménez e Laura Baldomà, 2016, Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells.
6. Christian Eriksson de Rezende, Suliman Al-Ghazlat, 2013, Feline Small Cell Lymphoma Versus Inflammatory Bowel Disease: Treatment and Prognosis.
7. Day, 2008, Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group.
8. G. Rossi, A. Jergens, M. Cerquetella, S. Berardi, E. Di Cicco, G. Bassotti, G. Pengo, J.S. Suchodolski, 2017, Effects of a probiotic (SLAB51TM) on clinica and histologic variables and microbiota of cats with chronic constipation/megacolon: a pilot study.
9. Jillian L. Pope, Sarah Tomkovich, Ye Yang, and Christian Jobin, 2016, Microbiota as a mediator of cancer progression and therapy.
10. J. S. Suchodolski, 2014, COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats.
11. Jan S. Suchodolski e Albert E. Jersens, 2016, Recent Advances and Understanding of Using Probiotic-Based Interventions to Restore Homeostasis of the Microbiome for the Prevention/Therapy of Bacterial Diseases.
12. Kazuaki Nakata, Yutaka Sugi, Hikari Narabayashi, Tetsuro Kobayakawa, Yusuke Nakanishi, Masato Tsuda, Akira Hosono, Shuichi Kaminogawa, Shigemasa Hanazawa, and Kyoko Takahashi, 2017, Commensal Microbiota-Induced MicroRNA Modulates Intestinal Epithelial Permeability through a Small GTPase ARF4.
13. Maayan Levy, Aleksandra A. Kolodziejczyk, Christoph A. Thaisse Eran Elinav, 2017, Dysbiosis and the immune system.
14. Michael A. Kiselow, Kennet M. Rassnick, Sean P. McDonough, Richard E. Goldestein, Kenneth W. Simpson, Tristan K. Weinkle, 2008, Outcome of cat with low grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995-2005).

15. Paolo Stefano Marcato, 2008, Patologia Sistematica Veterinaria Edizioni Edagricole.
16. Stephan C Bischoff, Giovanni Barbara, Wim Buurman, Theo Ockhuizen, Jörg-Dieter Schulzke, Matteo Serino, Herbert Tilg, Alastair Watson and Jerry M Wells, 2016, Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy.
17. Tim Vanuytsel, Séverine vermeire and isabelle Cleynen, 2013, The role of Haptoglobin and its related protein, Zonulin, in inflammatory bowel disease.
18. Valeria García-castillo, Enrique Sanhueza, Eileen McNerney, Sergio A. Onate e Apolinaria García, 2016, Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle.
19. Vanessa Barrs and Julia Beatty, 2012, Feline alimentary lymphoma classification, risk factors, clinical signs and non-invasive diagnostics.
20. Withrow e MacEwen's, 2007, small animal clinical oncology, saunders elsevier editore.
21. Zhe Lu, Lei Ding, Qun Lu e Yan-Hua Chen, 2013, Claudins in intestines Distribution and functional significance in health and diseases.
22. Zoe V. Marshall-Jones, Marie-Louise A. Baillon, Julie M. Croft, Richard F. Butterwick, 2005, Effects of Lactobacillus acidophilus as a probiotic in healthy adult cats.