

ESPRESSIONE DELLA 5-LIPOSSIGENASI (5-LOX) E DELLA CICLOOSSIGENASI-2 (COX-2) IN CORSO DI PNEUMOPATIE INFIAMMATORIE DEL SUINO: INDAGINI PRELIMINARI

5-LIPOXYGENASE (5-LOX) AND CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) EXPRESSION IN PORCINE INFLAMMATORY LUNG DISEASES: PRELIMINARY INVESTIGATIONS

GIUSEPPE MARRUCHELLA G.¹,
ROBERTO GIACOMINELLI-STUFFLER¹, MARINA BAFFONI¹,
GIULIO GRANITO², MAURO MACCARRONE¹

¹*Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Piazza A. Moro 45, 64100 – Teramo*

²*Medico Veterinario, Libero Professionista, Forlì.*

Parole chiave: suino, polmoniti, patogenesi, 5-lipossigenasi, cicloossigenasi-2, eicosanoidi.

Key words: swine, pneumonia, pathogenesis, 5-lipoxygenase, cyclooxygenase-2, eicosanoids.

Riassunto. Gli eicosanoidi derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico e svolgono molteplici attività biologiche. Il presente lavoro si pone l'obiettivo di valutare l'espressione della 5-lipossigenasi (5-LOX) e della cicloossigenasi-2 (COX-2) – enzimi chiave per la produzione rispettivamente di leucotrieni e prostaglandine – e la rilevanza patogenetica delle succitate vie enzimatiche in corso di differenti pneumopatie infiammatorie del suino.

A tal fine, campioni di parenchima polmonare sono stati prelevati sia da suini sani di controllo, sia da suini affetti da polmonite enzootica, da pleuropolmonite e da polmonite interstiziale PCV2-associata. I suddetti campioni sono stati processati e sottoposti ad idonee indagini istopatologiche, immunohistochimiche e biochimiche (*Western blot*, WB).

Nei soggetti di controllo, l'espressione della 5-LOX e della COX-2 è apparsa di modesta entità e pressochè esclusivamente limitata alle cellule dell'epitelio bronchiolare. Per contro, in condizioni patologiche, le stesse indagini immunohistochimiche ed in WB hanno dimostrato una maggiore espressione di entrambi gli enzimi oggetto di studio da parte di una vasta gamma di tipi cellulari.

I risultati delle nostre indagini inducono a ritenere che leucotrieni e prostaglandine possano partecipare attivamente alla patogenesi di differenti pneumopatie infiammatorie del suino.

Summary. *Eicosanoids are products of the arachidonic acid metabolism and play a multitude of biologic actions. The present study aims at investigating the role of 5-lipoxygenase (5-LOX) and cyclooxygenase-2 (COX-2) dependent enzymatic pathways in the pathogenesis of different porcine inflammatory lung diseases (enzootic pneumonia, pleuropneumonia, PCV2-associated interstitial pneumonia).*

Pulmonary tissue samples from healthy control and diseased pigs were collected and processed for histopathological, immunohistochemical, and biochemical investigations (Western blot, WB). In control animals, immunohistochemistry demonstrated both 5-LOX and COX-2 expression, which were almost exclusively limited to the bronchiolar epithelial cells. Diseased pigs showed a stronger

5-LOX and COX-2 specific immunoreactivity, which involved a wide range of cell types, as confirmed by immunohistochemical and WB investigations.

On the basis of what above, our results demonstrate that 5-LOX and COX-2 are differently expressed in normal versus diseased lungs, thus suggesting the likely involvement of both biochemical pathways in the pathogenesis porcine lung inflammatory diseases.

INTRODUZIONE

La patologia respiratoria, nell'accezione più ampia del termine, è causa di ingenti danni economici e sanitari in suinicoltura. L'eziologia delle malattie respiratorie del suino è quantomai complessa e diversificata; infatti, le sindromi respiratorie negli allevamenti intensivi rappresentano il risultato finale dell'interazione fra molteplici microrganismi dotati di potere patogeno (virus, micoplasmi, batteri), nonché fra questi ultimi e fattori "manageriali" di varia natura.

Quanto appena premesso rende ragione della definizione di "complesso respiratorio multifattoriale" (*Porcine Respiratory Disease Complex*, PRDC), la quale racchiude al suo interno l'insieme delle problematiche respiratorie proprie della suinicoltura moderna.

L'avvento di nuovi strumenti investigativi, con particolare riferimento alle tecniche di indagine biomolecolari, ha condizionato positivamente l'approccio diagnostico al PRDC. Parallelamente, nel tempo sono stati sviluppati numerosi presidi terapeutici e profilattici allo scopo di limitare i danni osservati in corso di PRDC (5).

I farmaci anti-infiammatori di comune impiego nella terapia delle sindromi respiratorie svolgono la loro azione inibendo la sintesi degli eicosanoidi. Tuttavia, le conoscenze relative al coinvolgimento patogenetico degli eicosanoidi in corso di pneumopatie infiammatorie del suino risultano al momento lacunose.

Gli eicosanoidi derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico e regolano una vasta gamma di processi biologici, infiammazione *in primis*. Il metabolismo dell'acido arachidonico può procedere lungo due vie enzimatiche principali: a) lipossigenasi (LOX), responsabili della produzione dei leucotrieni e lipossine; b) cicloossigenasi (COX), responsabili della produzione di prostaglandine e trombossani (8).

Il presente lavoro si pone l'obiettivo di valutare l'espressione della 5-LOX e della COX-2 – enzimi chiave per la produzione rispettivamente di leucotrieni e prostaglandine – e la rilevanza patogenetica delle succitate vie enzimatiche in corso di differenti pneumopatie infiammatorie del suino. L'espressione della 5-LOX e della COX-2 verrà valutata dal punto di vista qualitativo e semi-quantitativo, attraverso idonee indagini morfologiche e biochimiche (*Western blot*, WB).

MATERIALI E METODI

Sono stati finora oggetto di indagine 10 animali così ripartiti: 2 soggetti sani di controllo, 4 suini affetti da polmonite enzootica da *Mycoplasma hyopneumoniae*, 2 suini affetti da pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* e 2 suini affetti da "sindrome PCV2-associata" (*Porcine Circovirus type 2 Associated Disease*, PCVAD). In sede autoptica, da ciascun soggetto sono stati prelevati campioni rappresentativi di parenchima polmonare.

I tessuti destinati alle indagini morfologiche sono stati immediatamente fissati in formalina neutra tamponata al 10% ed inclusi in paraffina come di routine.

Sezioni di parenchima polmonare sono state colorate mediante ematossilina-eosina per le va-

lutazioni istopatologiche del caso.

L'immunoistochimica nei confronti della 5-LOX è stata eseguita utilizzando un anticorpo policlonale caprino (C-19, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) alla diluizione finale di 1:500. Al fine di ottenere un efficace smascheramento antigenico, le sezioni sono state sottoposte a trattamento termico in tampone citrato 0.01 M (pH 6.0) a 96°C per 45 min. L'immunoistochimica nei confronti della COX-2 è stata eseguita utilizzando un anticorpo policlonale caprino (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) alla diluizione finale di 1:250. In questo caso, lo smascheramento antigenico è stato ottenuto autoclavando le sezioni tessutali in tampone citrato 0.01 M (pH 6.0) a 121°C per 2 min, come già descritto da Cho e Chae (2002). I campioni di parenchima polmonare destinati alle indagini in WB sono stati conservati a -80°C e successivamente risospesi in ghiaccio, sonicati e centrifugati. Le concentrazioni proteiche sono state misurate con il metodo Bradford (1976). Gli estratti cellulari proteici (20 µg/pozzetto) sono stati quindi caricati in gel SDS-poliacrilamide al 10% e trasferiti su membrane PVDF. Sono stati utilizzati gli stessi anticorpi primari sopra citati anti-5-LOX (1:500) ed anti-COX-2 (1:1000). Le reazioni sono state sviluppate impiegando un sistema di chemiluminescenza.

RISULTATI

Le indagini istopatologiche hanno documentato l'assenza di lesioni microscopiche nei 2 suini di controllo e, nel contempo, hanno permesso una dettagliata caratterizzazione delle diverse forme morbose oggetto di studio.

Negli animali affetti da polmonite enzootica si è osservata la tipica iperplasia del tessuto linfatico associato ai bronchi (*Bronchial Associated Lymphoid Tissue*, BALT) e, più in particolare, del BALT peribronchiolare. Il lume dei bronchi/bronchioli era spesso occupato da un abbondante infiltrato infiammatorio, costituito in prevalenza da granulociti neutrofili, mentre l'epitelio bronchiolare appariva iperplastico. Si notava, inoltre, il coinvolgimento alveolare con ispessimento dei setti ed iperplasia dei pneumociti di tipo II ("alveolite interstiziale"), mentre il lume degli alveoli conteneva un essudato composto in prevalenza da macrofagi ("alveolite desquamativa").

Nei suini affetti da pleuropolmonite, si notava l'intensa congestione dei setti alveolari, mentre i lumi alveolari erano occupati da fibrina, detriti cellulari e soprattutto da neutrofili degeneranti fusiformi ("oat cells"). Si osservavano, inoltre, la marcata dilatazione dei setti interlobulari ed il coinvolgimento pleurico.

Le lesioni microscopiche osservate in corso di PCVAD coincidevano con una classica polmonite interstiziale alveolo-settale, caratterizzata dal marcato ispessimento dei setti alveolari, infiltrati da macrofagi e linfociti, associato ad ipertrofia ed iperplasia dei pneumociti di tipo II.

Le indagini in WB hanno dimostrato l'espressione di entrambi gli enzimi oggetto di studio, sia nei suini sani di controllo sia negli animali affetti da diverse patologie polmonari, confermando la specificità degli anticorpi primari impiegati. Il segnale è risultato più intenso nei campioni "patologici" – soprattutto in corso di polmonite enzootica e di pleuropolmonite – rispetto ai soggetti sani di controllo.

In questi ultimi, le indagini immunoistochimiche hanno dimostrato una modesta espressione della 5-LOX e della COX-2, limitatamente alle cellule dell'epitelio bronchiale/bronchiolare, con *pattern nucleare e/o* citoplasmatico.

L'immunoreattività nei confronti della 5-LOX è apparsa molto più diffusa ed intensa in corso

di polmonite enzootica, soprattutto in corrispondenza delle cellule infiammatorie che occupavano il lume di bronchi, bronchioli ed alveoli. Un chiaro segnale immunoistochimico si è osservato anche all'interno dei pneumociti di tipo II iperplastici, nelle cellule muscolari lisce e nell'endotelio dei vasi sanguigni (soprattutto in sede sub-pleurica), nelle cellule dell'endotelio dei vasi linfatici ed in minor misura nell'epitelio bronchiolare e nei condrociti.

Parimenti diffusa ed intensa è risultata l'immunoreattività nei confronti della 5-LOX in corso di pleuropolmonite, con marcato coinvolgimento anche della superficie pleurica e delle *oat cells*.

Di minore entità è risultata, invece, l'espressione della 5-LOX nelle forme di polmonite interstiziale oggetto di studio, con immunoreattività specifica in corrispondenza dell'epitelio bronchiale/bronchiolare, di macrofagi presenti nei setti alveolari, di piccoli *clusters* di granulociti neutrofili e delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni (soprattutto in sede sub-pleurica). L'espressione della COX-2 è risultata più intensa e soprattutto più diffusa rispetto alla 5-LOX in tutti i campioni "patologici" oggetto di indagine, raggiungendo i massimi livelli in corso di polmonite enzootica e di pleuropolmonite. L'immunoreattività specifica nei confronti della COX-2 si è rivelata particolarmente marcata in corrispondenza delle cellule dell'epitelio bronchiale/bronchiolare e delle ghiandole bronchiali, delle cellule infiammatorie (soprattutto macrofagi alveolari) e dell'endotelio dei vasi sanguigni. Da sottolineare l'intensa immunoreattività osservata in sede pleurica in corso di pleuropolmonite.

DISCUSSIONE

L'enzima 5-LOX ha importanza cruciale nella sintesi dei leucotrieni, potenti fattori vasoattivi e spasmogeni coinvolti in diversi processi patologici. Si ritiene che i leucotrieni possano intervenire attivamente nella patogenesi di molte malattie, anche a carico dell'apparato respiratorio (11).

I risultati delle nostre indagini dimostrano che la 5-LOX è fisiologicamente espressa dal parenchima polmonare e che la via enzimatica 5-LOX-dipendente viene attivata nel corso di differenti pneumopatie infiammatorie del suino, il che suggerisce il coinvolgimento attivo dei leucotrieni nella patogenesi delle malattie oggetto di studio. Al riguardo, gli approcci investigativi impiegati – immunoistochimica e WB – concordemente indicano che l'espressione della 5-LOX è particolarmente esaltata in corso di polmonite enzootica e di pleuropolmonite.

Si è a lungo ritenuto che la 5-LOX fosse espressa in quantità apprezzabili soltanto dai "leucociti". Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che il *range* dei tipi cellulari in grado di esprimere la 5-LOX è ben più ampio (6, 7, 9). In accordo con quanto sopra, i risultati delle nostre indagini dimostrano che anche le cellule epiteliali dei bronchi/bronchioli, i pneumociti, le cellule muscolari lisce, le cellule endoteliali ed i condrociti possono partecipare attivamente alla sintesi dei leucotrieni in corso di pneumopatie infiammatorie del suino.

È interessante notare che l'espressione della 5-LOX è indotta in modo differente e specifico a seconda della malattia in atto e dell'eziologia della stessa. Ad esempio, in nessuno dei campioni oggetto di studio si è osservata immunoreattività specifica nella muscolatura liscia bronchiolare; quest'ultima risulta, al contrario, intensamente immunoreattiva in corso di broncopolmonite verminosa del suino (10).

La COX esiste in due isoforme distinte: a) la COX-1 è espressa in modo "costitutivo" da parte di molti tipi cellulari; b) la COX-2 è "indotta" in seguito all'azione di stimoli pro-

infiammatori (8). Tale distinzione non è tuttavia esente da critiche. In linea con la letteratura più recente (12) i nostri dati confermano che la COX-2 viene espressa, seppur in quantità modeste, anche in condizioni fisiologiche. Nel contempo, le nostre indagini confermano il carattere altamente “inducibile” della COX-2 in corso di malattie polmonari a carattere infiammatorio (3, 4).

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati delle nostre indagini indicano che le vie biochimiche 5-LOX-dipendente e COX-2-dipendente sono entrambe esaltate nel corso di pneumopatie infiammatorie del suino sostenute da agenti eziologici diversi e caratterizzate da quadri lesivi specifici.

Bibliografia

1. Bradford M.B. (1976) “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding”. *Anal Biochem* **72**, 248.
2. Cho W.S., Chae C. (2002) “Immunohistochemical detection of cyclooxygenase-2 in lungs of pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*”. *J Comp Pathol* **127**, 274-279.
3. Cho W.S., Chae, C. (2003) “Expression of cyclooxygenase-2 in swine naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*”. *Vet Pathol* **40**, 25-31.
4. Cho W.S., Chae C. (2004) “Expression of nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase-2 in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*”. *Vet Pathol* **41**, 666-672.
5. Halbur P.G. (1997) “Porcine Respiratory Disease Complex”. *Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar*. <http://mark.asci.ncsu.edu/HealthyHogs/book1997/halbur2.htm>.
6. James A.J., Penrose J.F., Cazaly A.M., Holgate S.T., Sampson A.P. (2006) “Human bronchial fibroblast express the 5-lipoxygenase pathway”. *Respir Res* **7**, 102.
7. Komatsu N., Natsui K., Ueda N., Watanabe K., Yamamoto, S. (1991) “Immunohistochemical study on arachidonate 5-lipoxygenase in porcine leukocytes and other tissues”. *J Histochem Cytochem* **39**, 655-662.
8. Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Mitchell R.N. (2007) “Robbins Basic Pathology”, 8a ed., USA, Saunders Elsevier.
9. Luo M., Lee S., Brock T.G. (2003) “Leukotriene synthesis by epithelial cells”. *Histol Histopathol* **18**, 587-595.
10. Marruchella G., Giacomini-Stuffer R., Baffoni M., Maccarrone M. (2008) “Ruolo dell'enzima 5-lipossigenasi (5-LOX) nella patogenesi della broncopneumonia verminosa del suino: indagini immunostochimiche e biochimiche”. *Atti del V Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Patologia Veterinaria, Palermo, 15-16 maggio 2008*, 69.
11. Peters-Golden M., Henderson W.R. (2007) “Leukotrienes”. *N Engl J Med* **357**, 1841-1854.
12. Zidar N., Odar K., Glavac D., Jerse M., Zupanc T., Stajer, D. (2008) “Cyclooxygenase in normal human tissues – is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform?”. *J Cell Mol Med*, epub ahead of print.