

# DENSITÀ DI PLASMACELLE NELLE VIE GENITALI DI SCROFETTE

DE LUCIA A., BIANCO C., OSTANELLO F., AVALLONE G., NANNONI E., SARLI G.

*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna*

**Parole chiave:** immunità mucosale, plasmacellule, apparato genitale, scrofetta

*Key words:* mucosal immune system, plasma cells, genital tract, gilt

## **Riassunto**

L'immunità mucosale svolge un ruolo importante come prima linea di difesa contro molti patogeni. E' quindi importante definire, nei diversi tratti dell'apparato genitale femminile, quale sia la risposta mucosale e quanto essa sia influenzata dallo stato gravidico. Campioni prelevati da 3 segmenti dell'apparato genitale (vagina, cervice e utero) di 24 scrofette di 6 mesi di età sono stati esaminati utilizzando una metodica immunocitochimica per l'identificazione delle plasmacellule (PC) producenti le immunoglobuline di isotipo A, G ed M. Mediante analisi di immagine è stata eseguita anche la valutazione della densità delle PC. L'endometrio è risultato essere il segmento in cui la densità di PC è maggiormente influenzata dalle variazioni ormonali dovute alla gravidanza. In soggetti non gravidi si è registrato un gradiente di concentrazione decrescente di PC totali (producenti IgA+IgM+IgG) procedendo dalla zona sub-epiteliale a quella ghiandolare superficiale ed infine alla ghiandolare profonda. Nei soggetti gravidi tale gradiente non si osserva in conseguenza della progressiva diminuzione, soprattutto di PC producenti IgA nello strato sub-epiteliale e di PC IgA+ e IgG+ nello strato ghiandolare superficiale. Indipendentemente dallo stato di gravidanza, nell'utero la densità maggiore si registra per PC contenenti l'isotipo anticorpale IgA. In cervice e vagina non si registrano variazioni significative nel confronto fra soggetti gravidi e non gravidi nel numero di PC totali. Inoltre la cervice si è rivelata, nei soggetti non gravidi, il distretto delle vie genitali con più alta densità di PC totali, con uno cambiamento di isotipo anticorpale prevalente rappresentato dalle IgG.

## **Abstract**

The mucosal immunity plays an important role as a first line of defense against pathogens, it is therefore interesting to investigate its role in the sow genital tract and if it is influenced by pregnancy. Three sites of genital tract (vagina, cervix, uterus) of 24 gilts, 6 months old, 12 pregnant and 12 non-pregnant have been sampled. In order to detect IgA, IgG and IgM producing plasma cells (PCs) an immunohistochemical assay was performed and an image analysis has been used to assess plasma cells density. The endometrium revealed to be the only segment where the PC density is affected by hormonal changes during pregnancy. In non-pregnant gilts, there was a decreasing gradient of total PC density (i.e. the sum of those producing IgA, IgM, IgG) from sub-epithelial area to the glandular superficial and finally to the deep glandular. In pregnant subjects this gradient is not observed as a result of the progressive decrease, especially of IgA-producing PCs in the sub-epithelial layer and of IgA and IgG + PCs in the superficial glandular layer. Regardless of the state of pregnancy, the uterus has the highest density of PC containing IgA isotype. In the cervix and vagina, there were no significant changes comparing pregnant and nonpregnant subjects in the total number of PCs. Furthermore the cervix revealed, in non-pregnant, the district of genital tract with the highest density of total PC, with a predominant antibody isotype change represented by IgG.

## **INTRODUZIONE**

L'immunità c.d. mucosale, cioè la risposta immunitaria specifica in essere sulle superfici mucose, è costituita sia da una stimolazione locale sia da una colonizzazione periferica di cellule immunocompetenti che si sono sensibilizzate altrove. In quest'ultimo caso, le cellule immunocompetenti vengono generate in seguito ad una risposta sistemica verso uno o più antigeni; tali cellule, integrando la popolazione immunocompetente locale delle superfici mucose, garantiscono un potenziamento della risposta specifica mucosale (7). Diverse indagini sperimentali hanno dimostrato come la somministrazione parenterale di un antigene possa stimolare anche la risposta locale mucosale e, per quanto riguarda le mucose dell'apparato digerente, in particolare quelle del piccolo intestino, le evidenze sperimentali a conferma di ciò sono molteplici (1, 3). E' comunque noto che non tutte le superfici mucose giovano con la stessa intensità dell'effetto sopra descritto in seguito a stimolazione sistemica ed inoltre molto scarse sono le informazioni in merito alle mucose delle vie genitali (10). Agenti patogeni, dannosi per l'integrità morfo-funzionale dell'utero o per i prodotti del concepimento, possono raggiungere le vie genitali per via ematica (via discendente) o risalendo le vie stesse dall'esterno (via ascendente). E' pertanto importante definire, nei diversi tratti dell'apparato genitale femminile (vagina, cervice, utero), se la risposta mucosale sia simile e quanto essa sia influenzata dallo stato gravidico che, come è noto, si caratterizza per l'induzione di una ipo-reattività immunologica locale con la finalità di evitare il "rigetto" del feto in risposta ad antigeni placentari di origine paterna, non tollerati dal sistema immunitario della madre (5,9).

Scopo di questo lavoro è stato quello di quantificare le plasmacellule (PC) produttrici dei 3 principali isotipi anticorpali potenzialmente presenti sulle superfici mucose (IgG, IgM, IgA) riscontrate in 3 tratti (vagina, cervice, utero) di scrofette gravide e non gravide, con la finalità di valutare eventuali differenze nei tratti a confronto e stimare l'influenza dello stato gravidico sul contenuto di PC immunoglobulino secernenti nelle vie genitali.

## **MATERIALI E METODI**

### **Animali**

Nello studio sono incluse scrofette di razza Large White di circa 6 mesi di età, provenienti da un allevamento convenzionale, e stabulate nei locali del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna.

I soggetti facevano parte di piani sperimentali che prevedevano un protocollo di superovulazione (i.m 1500 UI di eCG - equine chorionic gonadotropin) e 750 UI di hCG (human chorionic gonadotropin) seguito da una inseminazione con 1 o 2 dosi di seme (2, 8). I campioni oggetto di questa indagine sono stati prelevati da 12 scrofette scelte a caso tra quelle gravide e da 12 tra quelle non gravide, per un totale di 24 soggetti.

I protocolli di sperimentazione sono stati approvati dal Comitato Etico per la Sperimentazione Animale dell'Università di Bologna e dal Ministero della Salute. Gli studi sono stati condotti in accordo con quanto previsto dalla normativa europea relativamente alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali (Direttiva del Consiglio europeo, 86/609/EEC).

### **Indagini sierologiche**

La determinazione dei titoli anticorpali nei confronti di Porcine Circovirus type 2 (PCV2), Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV), Aujeszky's Disease virus (ADV) e Porcine Parvovirus (PPV) è stata condotta su campioni di siero prelevati 2 giorni prima dell'inseminazione (giorno -2) e al momento della soppressione.

## **Prelievo dei campioni**

I soggetti gravidi sono stati soppressi a 50 giorni di gravidanza con un protocollo farmacologico autorizzato dal Comitato Etico ed applicato anche ai soggetti non gravidi. Tutti i 24 soggetti sono stati sottoposti a necropsopia. Da ciascun soggetto sono state prelevate una porzione di vagina (V), cervice (C) e 3 segmenti di utero equidistanti a livello di corna ed alla base delle corna (UT1; UT2; UT3). Successivamente, i tessuti sono stati fissati in formalina al 10% e quindi inclusi in paraffina. Da ogni blocchetto di paraffina si sono ottenute 4 sezioni di 4  $\mu\text{m}$  di spessore. Di queste 4 sezioni, una è stata colorata con ematossilina-eosina (E-E) e 3 con colorazioni immunostochimiche che utilizzano anticorpi specifici per le immunoglobuline IgG, IgA e IgM di suino secondo protocolli già pubblicati (1).

I campioni di tessuto sono stati osservati con microscopio ottico Leica DMLB su cui era montata una fotocamera digitale Leica, per permettere di acquisire le immagini dei campi di osservazione. Le immagini acquisite sono state quindi trasferite su computer mediante un software di acquisizione compatibile InfanView, al fine di effettuare la conta cellulare utilizzando come software di analisi d'immagine ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

L'analisi qualitativa e quantitativa della PC è stata condotta sui 4 segmenti del tratto genitale: cervice, vagina, corpo uterino, corna uterine. Per la cervice e la vagina i conteggi sono stati eseguiti su 5 campi acquisiti a livello della zona sub-epiteliale (figura 1); per l'utero, la sottomucosa è stata suddivisa in tre zone: sub-epiteliale (a1), ghiandolare superficiale (a2) e ghiandolare profonda (a3) (figura 2) ed in ogni area sono state acquisite immagini relative a 5 campi. Tutte le immagini sono state acquisite a 40x.

Per ogni zona è stata selezionata manualmente la lamina propria escludendo la componente ghiandolare, vascolare ed epiteliale ed eventuali aree di artefatti dovuti alla processazione del campione con l'obiettivo di ottenere un'area di stima minima di 4000  $\mu^2$  all'interno della quale sono state contate le PC. In seguito si è proceduto alla conta manuale delle PC presenti all'interno dell'area identificata e di quelle intersecanti la linea di delimitazione dell'area. La densità delle PC è stata poi normalizzata come numero di plasmacellule/10000  $\mu^2$ . In totale sono state effettuate 2400 misurazioni, 100 per ciascun soggetto.

## **Analisi statistica**

Preliminarmente, la normalità della distribuzione campionaria è stata valutata utilizzando il test di Shapiro-Wilk. Sulla base dei risultati ottenuti, per i successivi confronti sono stati utilizzati il test di Kruskal-Wallis, il test di Mann-Whitney e il test di Friedman ANOVA. La significatività statistica è stata posta per  $p=0,05$ . L'analisi statistica è stata eseguita con il software Statistica 8 (Statsoft Inc, Dell Texas, US).

## **RISULTATI**

Non sono stati messi in evidenza incrementi dei titoli anticorpali anti PCV2, PRRSV, PPV e ADV tra il giorno -2 e il giorno dell'eutanasia; tutti i soggetti sono risultati costantemente negativi alla ricerca di anticorpi anti gE di ADV.

In tabella 1 sono riportati i risultati relativi alla densità di PC nei diversi tratti dell'apparato genitale ed in figura 3 esempi delle reazioni immunostochimiche.

Nella vagina non è stata messa in evidenza nessuna differenza statisticamente significativa nella densità totale di PC (calcolata come somma di PC secernenti IgG, IgM e IgA) tra i soggetti gravidi e non gravidi. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata confrontando le densità di PC producenti i singoli isotipi tra soggetti gravidi e non gravidi.

Per quanto riguarda la cervice, la gravidanza non influenza la densità totale di PC, ma si osserva una significativa maggiore densità di PC contenenti IgG nei soggetti non gravidi confrontati con quelli gravidi ( $p < 0,01$ ).

Confrontando, tra animali gravidi e non, i risultati ottenuti nei segmenti uterini, sono stati evidenziati due pattern distinti. Complessivamente nell'utero di soggetti gravidi si sono registrate densità di PC totali significativamente più basse ( $P < 0,001$ ) di quelle di soggetti non gravidi. Tale differenza è stata osservata anche prendendo in considerazione la densità delle sole PC secernenti IgG ( $P < 0,05$ ) o IgA ( $P < 0,001$ ). Nei soggetti non gravidi è presente un gradiente decrescente di PC, la cui densità diminuisce spostandosi dalla zona sub-epiteliale alla zona ghiandolare profonda; in questi animali è stata evidenziata una densità significativamente maggiore di PC secernenti IgA ( $p < 0,001$ ) rispetto a quelle secernenti gli altri due isotipi. In particolare, le PC secernenti IgA presentano una densità significativamente maggiore nell'area sub-epiteliale e ghiandolare superficiale rispetto all'area ghiandolare profonda (rispettivamente:  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ). Nei soggetti gravidi, invece, la densità di PC nell'utero si riduce significativamente poiché non si registra più il gradiente decrescente e la variazione è sostenuta da riduzione della densità di PC contenenti IgA prevalentemente a livello di strato ghiandolare superficiale ( $P < 0,01$ ) e di quelle contenenti IgA ( $p < 0,01$ ) e IgG ( $p < 0,05$ ) nello strato ghiandolare superficiale e, di conseguenza, delle totali ( $p < 0,01$ ).

Le PC contenenti IgA rappresentano la quota significativamente maggiore, nel confronto con gli altri isotipi, nell'utero sia gravido ( $P < 0,001$ ) che non gravido ( $p = 0,001$ ). Le plasmacellule contenenti IgA sono maggioritarie anche in vagina, mentre nella cervice prevalgono quelle contenenti IgG, in soggetti non gravidi. Nel confronto tra i 3 tratti (vagina, cervice, utero), sia nei soggetti gravidi che in quelli non gravidi il distretto che presenta una densità di PC totali significativamente maggiore è la cervice ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSIONE

Nelle diverse zone dell'apparato riproduttore della scrofa, la densità di plasmacellule secernenti immunoglobuline non è costante ed è influenzata, in maniera diversa, dallo stato ormonale conseguente alla gravidanza. Nella vagina, spesso indicata come organo con caratteristiche intermedie tra il tessuto linfoide associato alla pelle (SALT) e il tessuto linfoide associato alle mucose (MALT), e nella cervice, la densità totale delle PC non varia in maniera significativa con lo stato gravidico. La cervice è il tratto di apparato genitale con la maggiore densità di PC, con una predominanza di quelle secernenti IgG, nei soggetti non gravidi. Questa osservazione è in accordo con quanto riportato da Wu et al., (2000), i quali definiscono la cervice il sito immunologicamente più attivo dell'apparato genitale, in quanto "di guardia" fra il tratto genitale inferiore che comprende la vagina, e il tratto genitale superiore composto da utero e tube di Falloppio. In merito all'isotipo predominante in cervice, Hussen et al., (1983), esaminando scrofe di 2 anni di età, enfatizzano un maggior contenuto di PC producenti IgA, basandosi tuttavia esclusivamente sul confronto dei risultati grezzi, senza il supporto dell'analisi statistica. Per giustificare la divergenza fra i risultati del presente lavoro (predominanza delle IgG in cervice) e quelli ottenuti da Hussen et al., (1983) (nessuna differenza tra le diverse localizzazioni) si può ipotizzare l'azione di un fattore legato alla diversa età degli animali utilizzati nei 2 studi.

Per quanto riguarda l'endometrio degli animali non gravidi, è stato osservato un gradiente decrescente di PC, la cui densità diminuisce spostandosi dalla zona sub-epiteliale alla zona ghiandolare profonda. Questa diversa densità di PC nei diversi strati della parete uterina ha un andamento inverso rispetto a quello riscontrato nell'intestino (1), dove è stato osservato un aumento della densità delle PC lungo l'asse villo-crypta. La spiegazione di questa differenza risiede probabilmente in una diversa funzione delle ghiandole di questi due apparati: nell'intestino le ghiandole sono principalmente deputate alla secrezione di muco che deve contenere immunoglobuline, mentre nello stroma endometriale la componente ghiandolare non deve secernere muco contenente immunoglobuline, ma prioritariamente secreto utile nelle prime fasi della gravidanza.

Inoltre, secondo i risultati del presente lavoro, l'assetto ormonale legato alla gravidanza annulla il gradiente decrescente di PC riscontrato negli animali non gravidi, inducendo una riduzione delle PC secernenti IgA prevalentemente a livello di strato sub-epiteliale e di PC secernenti IgA e IgG nello strato ghiandolare superficiale dell'utero. Queste osservazioni sono solo parzialmente confrontabili con quelle presenti in letteratura, in quanto Hussen et al., (1983) hanno preso in considerazione solo animali non gravidi mentre Kaeoket et al., (2003) riportano solo la densità totale di PC senza discriminare la produzione dei diversi isotipi. Kaeoket et al., (2003) riferiscono invece di un pattern di distribuzione inverso, crescente dall'alto verso il basso, senza tuttavia fornire una validazione statistica.

In merito alla predominanza di PC secernenti IgA rispetto alla densità di PC secernenti altri isotipi, riscontrata sia nei soggetti gravidi sia in quelli non gravidi, le osservazioni condotte nel presente lavoro risultano essere solo parzialmente confrontabili con altri risultati presenti in letteratura, poiché non sono disponibili, a nostra conoscenza, studi condotti su animali gravidi. I risultati ottenuti sono però in contrasto con quanto riportato da Hussen et al., (1983) che asseriscono essere le IgG le PC più numerose nell'utero delle scrofe non gravide. Tuttavia, anche questa affermazione, deriva dalla valutazione dei dati grezzi, senza nessuna validazione statistica.

I risultati della presente indagine individuano quindi nell'utero il distretto mucosale delle vie genitali più influenzato dalla gravidanza con l'induzione di una forte riduzione di PC contenenti IgA, che comunque resta l'isotipo più frequente indipendentemente dalla gravidanza. La cervice invece è il tratto più ricco di PC in assoluto con prevalenza di IgG nei soggetti non gravidi. Sono comunque necessari ulteriori studio per stimare variazioni legate all'età e come la risposta mucosale locale possa variare con l'esposizione ad agenti eziologici potenzialmente in grado di causare turbe riproduttive nella scrofa.

## **RINGRAZIAMENTI.**

Si ringraziano Merial S.A.S. (Lione-Francia) per avere supportato lo studio, i gruppi di ricerca della Prof.ssa Maria Laura Bacci e del Prof. Luca Sardi del DIMEVET (Bologna) per la gestione della parte in vivo dell'esperimento e la Dott.ssa V. Felice per il sostegno datomi durante la stesura della tesi da cui questo lavoro è tratto.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bianco, C., Felice, V., Panarese, S., Marrocco, R., Ostanello, F., Brunetti, B., Muscatello, L.V., Leotti, G., Vila, T., Joisel, F., Sarli, G., 2014. Quantitative immunohistochemical assessment of IgA, IgM, IgG and antigen-specific immunoglobulin secreting plasma cells in pig small intestinal lamina propria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 160, 281–287.
2. Bianco, C., Sarli, G., Panarese, S., Bacci, M.L., Galeati, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Lelli, D., Leotti, G., Vila, T., Joisel, F., Ostanello, F., 2015. PCV2 Infection in Vaccinated Conventional Gilts Inseminated with PCV2b-Spiked Semen. *Pak. Vet. J.* 35, 293-298.
3. Bourges, D., Chevalyere, C., Wang, C., Berri, M., Zhang, X., Nicaise, L., Meurens, F., Salmon, H., 2007. Differential expression of adhesion molecules and chemokines between nasal and small intestinal mucosae: implications for T- and sIgA + B-lymphocyte recruitment. *Immunology* 122, 551–561.
4. Hussein, A.M., Newby, T.J., Bourne, F.J., 1983. Immunohistochemical studies of the local immune system in the reproductive tract of the sow. *J. Reprod. Immunol.* 5, 1-15.

5. Kaeoket, K., Persson, E., Dalin, A.M., 2001. The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 95–114.
6. Kaeoket, K., Persson, E., Dalin, A.-M., 2003. Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow endometrium. *Anim. Reprod. Sci.* 75, 55–71.
7. Lamichhane, A., Azegami, T., & Kiyono, H., 2014. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine*, 32, 49, 6711-6723.
8. Sarli, G., Morandi, F., Panarese, S., Bacci, B., Ferrara, D., Bianco, C., Fusaro, L., Bacci, M.L., Galeati, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Lelli, D., Leotti, G., Vila, T., Joisel, F., Allan, G., Benazzi, C., Ostanello, F., 2012. Reproduction in porcine circovirus type 2 (PCV2) seropositive gilts inseminated with PCV2b spiked semen. *Acta Vet Scand.* 54:51.
9. Segerson, E.C., Beetham, P.K., 2000. Immunosuppressive macromolecules of endometrial and conceptus origins in livestock species. *J. Reprod. Immunol.* 48, 27–46
10. Wilson, H.L., Obradovic, M.R., 2014. Evidence for a common mucosal immune system in the pig. *Mol. Immunol.*
11. Wu, H.-Y., Abdu, S., Stinson, D., Russell, M.W., 2000. Generation of female genital tract antibody responses by local or central (common) mucosal immunization. *Infect. Immun.* 68, 5539–5545.

**Tabella 1.** Media±deviazione standard del numero di plasmacellule/10000  $\mu^2$  nei diversi tratti dell'apparato riproduttivo delle scrofette, con dati totali (ultima colonna) e separati per isotipo anticorpale. NG = non gravidi; G = gravidi.

*Table 1. Mean  $\pm$  standard deviation of the plasma cells number / 10000  $\mu^2$  in the different segments of the genital tract. Data of antibody isotype containing PC and of total PC total are shown for non-pregnant (NG) and pregnant (G) gilts.*

Tratto genitale	zona	IgA		IgG		IgM		PC tot	
		NG	G	NG	G	NG	G	NG	G
Vagina		2,3 $\pm$ 1,4	2,1 $\pm$ 1,4	1,9 $\pm$ 1,4	2,0 $\pm$ 2,0	1,0 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 0,6	5,2 $\pm$ 2,1	3,6 $\pm$ 3,1
Cervice		1,9 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 2,2	3,4 $\pm$ 3,1	2,2 $\pm$ 1,8	1,2 $\pm$ 1,2	1,5 $\pm$ 0,7	6,6 $\pm$ 3,8	5,0 $\pm$ 3,4
Utero	a1	2,0 $\pm$ 1,9	1,3 $\pm$ 3,3	1,4 $\pm$ 2,4	0,6 $\pm$ 2,3	0,6 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 1,1	3,9 $\pm$ 3,4	2,3 $\pm$ 4,4
	a2	1,1 $\pm$ 1,1	0,2 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,7	0	0,4 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 1,9	0,5 $\pm$ 0,8
	a3	0,2 $\pm$ 0,4	0	0,2 $\pm$ 0,5	0	0	0	0,3 $\pm$ 0,6	0

Figura 1. Sezioni di cervice (a sinistra) e di vagina (a destra) in cui viene indicata l'area (zona sub-epiteliale) di conteggio.

Figure 1: Pictures of cervix (on the left) and of vagina (on the right) in which the zone (sub-epithelial) of cell count is indicated.

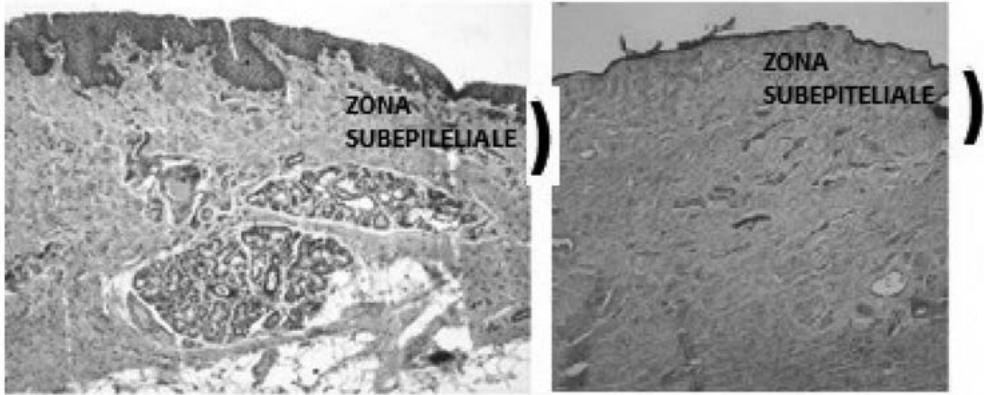


Figura 2 - A sinistra disegno raffigurante gli strati della parete uterina in cui, nell'endometrio, vengono indicati i livelli di profondità (zone) oggetto di conteggio. Sulla destra la microfotografia di una sezione di utero della casistica in esame clorata con ematossilina eosina con indicazione delle zone.

Figure 2: On the left a tracery of the uterine wall layers and the zones of the endometrium evaluated for PC density. On the right an histologic picture with the indication of the area 1 (a1), area 2 (a2) and area 3 (a3) zones.

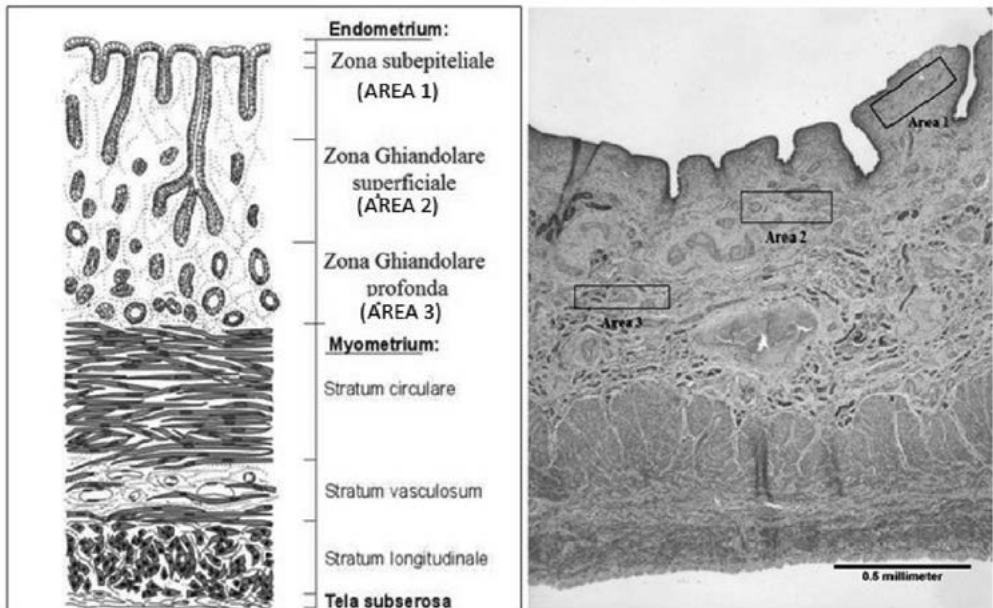


Figura 3. Quadri di reazioni immunoistochimiche con anticorpi anti-IgA, -IgG e -IgM di suino in vagina, cervice ed utero di suino.

Figure 3. Pictures of immunohistochemical stain by anti-swine IgA, IgM and IgG in vagina, cervix and uterus.

