

# GLI EICOSANOIDI NELLE PNEUMOPATIE INFIAMMATORIE DEL SUINO

## *EICOSANOIDS IN PORCINE LUNG DISEASES*

MARRUCHELLA G., GIACOMINELLI-STUFFLER R., MACCARRONE M.

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

**Parole chiave:** leucotrieni, prostaglandine, 5-lipossigenasi, cicloossigenasi-2, polmoniti, suino  
**Key words:** leukotrienes, prostaglandins, 5-lipoxygenase, cyclooxygenase-2, pneumonia, swine

### **RIASSUNTO**

Gli eicosanoidi derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico e svolgono molteplici funzioni, ben oltre la nota proprietà di mediare alcuni eventi chiave dei processi flogistici. Si riportano i dati relativi all'espressione della 5-lipossigenasi (5-LOX) e della cicloossigenasi-2 (COX-2), ed alla conseguente produzione di leucotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e di prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), in corso di varie pneumopatie infiammatorie del suino, sostenute da agenti eziologici differenti e verosimilmente caratterizzate da meccanismi patogenetici specifici. Sono stati oggetto di studio campioni di parenchima polmonare prelevati da soggetti sani di controllo e da suini affetti dalle seguenti patologie: broncopolmonite verminosa da *Metastrongylus* spp., polmonite enzootica da *Mycoplasma hyopneumoniae*, pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, polmonite interstiziale da *Porcine Circovirus type 2* (PCV-2). I risultati delle nostre indagini, condotte attraverso opportune tecniche immunostochimiche e biochimiche, dimostrano che l'attività di 5-LOX e COX-2, nonché la sintesi di LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub>, si modificano in senso quali-quantitativo in corso di pneumopatie infiammatorie del suino. Ciò induce a ritenere che leucotrieni e prostaglandine possano contribuire significativamente alla patogenesi delle malattie infiammatorie del polmone.

### **ABSTRACT**

Eicosanoids are products of the arachidonic acid metabolism and play a multitude of biologic actions, not only as chemical mediators of inflammation. We report herein data about 5-lipoxygenase (5-LOX) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, as well as about leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthesis in porcine inflammatory lung diseases, which are caused by different etiologic agents. Pulmonary tissue samples were collected from healthy controls and from pigs affected by parasitic bronchopneumonia (*Metastrongylus* spp.), enzootic pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*), pleuropneumonia (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), interstitial pneumonia (*Porcine Circovirus type 2*, PCV-2). Immunohistochemical and biochemical investigations showed that 5-LOX and COX-2 activities, as well as LTB<sub>4</sub> and PGE<sub>2</sub> synthesis, are significantly increased in porcine pneumonia, thus suggesting their likely involvement in the pathogenesis of porcine lung inflammatory diseases.

### **INTRODUZIONE**

Le malattie respiratorie del suino sono solitamente il frutto di complesse interazioni che vengono a stabilirsi tra agenti patogeni e fattori ambientali. Per tale motivo, è attualmente in uso la definizione di "complesso delle malattie respiratorie del suino" (*Porcine Respiratory*

*Disease Complex*, PRDC) per descrivere un insieme di pneumopatie, sostenute da agenti eziologici diversi, in grado di indurre manifestazioni cliniche e di compromettere le *performances* produttive degli animali. I meccanismi patogenetici coinvolti in corso di PRDC sono in buona parte ancora sconosciuti. Virus e batteri pneumotropi agiscono spesso in sinergismo e posseggono fattori di virulenza che permettono loro di resistere alle difese immunitarie dell'ospite e di causare alterazioni morfologiche e funzionali (Brockmeier *et al.*, 2002).

Gli eicosanoidi sono metaboliti dell'acido arachidonico (AA) in grado di svolgere molteplici funzioni biologiche. Il metabolismo dell'AA può procedere lungo due vie enzimatiche principali. Le lipossigenasi (LOX) sono responsabili della produzione di leucotrieni (LT) e lipossine, mentre le cicloossigenasi (COX) sintetizzano prostaglandine (PG) e trombossani (Kumar *et al.*, 2007).

Obiettivo della presente indagine è stato valutare il ruolo delle vie metaboliche 5-LOX e COX-2 dipendenti nella patogenesi di varie pneumopatie infiammatorie del suino, sostenute da agenti eziologici diversi e verosimilmente frutto di meccanismi patogenetici specifici.

## **MATERIALI E METODI**

Sono stati oggetto di studio campioni parenchima polmonare prelevati da suini sani di controllo regolarmente macellati (n = 4) e da suini affetti dalle seguenti patologie respiratorie: broncopolmonite verminosa da *Metastrongylus* spp. (n = 4), polmonite enzootica da *Mycoplasma hyopneumoniae* (n = 4), pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (n = 4), polmonite interstiziale da *Porcine Circovirus type 2* (PCV-2, n = 4). In tutti i casi, la diagnosi eziologica è stata confermata mediante idonee indagini di laboratorio.

Aliquote di ciascun campione tessutale sono state fissate in formalina neutra tamponata al 10%, incluse in paraffina e destinate alle indagini istopatologiche ed immunoistochimiche. In particolare, l'immunoistochimica per 5-LOX e COX-2 è stata eseguita seguendo un protocollo già precedentemente pubblicato ed al quale si rimanda per ulteriori dettagli (Marruchella *et al.*, in press).

I campioni destinati alle indagini biochimiche sono stati, invece, immediatamente congelati e stoccati a -80°C. L'espressione di 5-LOX e COX-2 è stata valutata mediante *Western Blotting* e specifici test di attività enzimatica, secondo quanto già riportato in letteratura (Marruchella *et al.*, in press).

I metaboliti dell'AA (LT<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub>) sono stati quantificati utilizzando kit disponibili in commercio (Leukotriene B<sub>4</sub> EIA Kit™, Prostaglandin E2 EIA Kit™, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA).

I risultati delle indagini biochimiche sono stati sottoposti ad analisi statistica (Mann-Whitney U test, InStat 3™ program, GraphPAD Software for Science, San Diego, California).

## **RISULTATI**

Le indagini istopatologiche hanno confermato l'assenza di lesioni apprezzabili nei suini di controllo e, nel contempo, hanno permesso la caratterizzazione dettagliata delle diverse forme morbose oggetto di indagine.

Nei soggetti di controllo, le indagini immunoistochimiche hanno dimostrato una modesta espressione di 5-LOX e COX-2, per lo più circoscritta alle cellule dell'epitelio bronchiale/bronchiolare. L'immunoreattività nei confronti di 5-LOX e COX-2 è, invece, risultata molto più intensa in tutte le pneumopatie oggetto di studio, coinvolgendo una vasta gamma di citotipi differenti (vedi Tabelle 1-2).

	Epitelio bronchiolare	Muscolatura liscia	Macrofagi	Granulociti neutrofili	Pneumociti	Endotelio	Mesotelio
<b>Controllo</b>	+	-	--	-	-	-	-
<b>Broncopolmonite verminosa</b>	++	+++	++	+	++	+	-
<b>Polmonite enzootica</b>	++	-	+++	+++	++	+	-
<b>Pleuropolmonite</b>	++	-	+	++	+	+++	-
<b>Polmonite interstiziale</b>	++	-	++	+	+	+	-

**Tabella 1.** Valutazione immunohistochimica dell'espressione della 5-LOX da parte di differenti tipi cellulari (= assenza di immunoreattività; + = immunoreattività modesta; ++ = intensa immunoreattività; +++ = immunoreattività estremamente marcata).

	Epitelio bronchiolare	Muscolatura liscia	Macrofagi	Granulociti neutrofili	Pneumociti	Endotelio	Mesotelio
<b>CONTROLLO</b>	+	-	--	-	-	-	-
<b>Broncopolmonite verminosa</b>	++	+	+	+	+	+	-
<b>Polmonite enzootica</b>	++++	-	+++	+++	+	++	-
<b>Pleuropolmonite</b>	+++	-	+++	+++	+	++	+++
<b>Polmonite interstiziale</b>	++	-	+++	+	++	+	-

**Tabella 2.** Valutazione immunohistochimica dell'espressione della COX-2 da parte di differenti tipi cellulari (= assenza di immunoreattività; + = immunoreattività modesta; ++ = intensa immunoreattività; +++ = immunoreattività estremamente marcata).

Il *Western Blotting* ha dimostrato l'espressione di 5-LOX e COX-2 in tutti i suini oggetto di studio. Tuttavia, il segnale immunobiochimico è risultato più intenso in corso di polmonite enzootica, pleuropolmonite e polmonite interstiziale da PCV-2. Anche l'attività enzimatica di 5-LOX e COX-2, nonché le concentrazioni di LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> sono risultate significativamente più elevate in corso di polmonite enzootica, pleuropolmonite e polmonite interstiziale da PCV-2.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli eicosanoidi sono mediatori chimici di natura lipidica in grado di mediare la maggior parte degli eventi che caratterizzano l'infiammazione acuta (Ackermann, 2007). I LT determinano vasodilatazione e broncocostrizione, svolgendo un ruolo rilevante nella patogenesi dell'asma bronchiale (Lewis *et al.*, 1990; Peters-Golden and Henderson, 2007). Tuttavia, la sintesi di LT è dimostrabile – *in vivo* ed *in vitro* – in corso di infezioni sostenute da batteri (Hopkins *et al.*, 1989; Coffey *et al.*, 2004), virus (Hennet *et al.*, 1992), funghi (Castro *et al.*, 1993), protozoi (Locksley *et al.*, 1985) e parassiti (Marruchella *et al.*, in press). *In vivo*, i LT contribuiscono alle difese immunitarie innate sia direttamente, stimolando la chemiotassi dei leucociti (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980; Tager *et al.*, 2003) e la fagocitosi (Coffey *et al.*, 1998; Talvani *et al.*, 2002), sia indirettamente inducendo la sintesi di altri mediatori (Peters-Golden *et al.*, 2005). I risultati delle nostre indagini dimostrano che la via metabolica 5-LOX dipendente viene attivata in diverse patologie polmonari, pur diverse per eziologia, quadri lesivi macro/

microscopici e meccanismi patogenetici. Pertanto, 5-LOX e LTB<sub>4</sub> sono verosimilmente parte integrante delle difese dell'ospite nei confronti di parassiti, virus e batteri responsabili delle patologie respiratorie oggetto di studio. I dati qui presentati confermano, inoltre, che molti tipi cellulari sono in grado di esprimere livelli apprezzabili di 5-LOX, soprattutto in corso di pneumopatie infiammatorie. È interessante notare che l'espressione della 5-LOX è indotta in modo differente e "specifico" – dal punto di vista quali-quantitativo – a seconda dell'agente eziologico coinvolto e verosimilmente dei meccanismi patogenetici implicati.

Le PG sono prodotte da quasi tutte le cellule ed agiscono con meccanismo autocrino, paracrino ed endocrino, attraverso l'interazione con recettori specifici. L'espressione della COX-2 è fisiologicamente modesta o del tutto assente nella maggior parte dei tessuti. I lipopolisaccaridi batterici sono notoriamente in grado di indurre l'espressione della COX-2. Precedenti indagini hanno dimostrato il coinvolgimento della COX-2 nella patogenesi di alcune patologie respiratorie del suino ad eziologia batterica (Cho and Chae, 2002, 2003, 2004) e parassitaria (Marruchella *et al.*, in press). Le nostre indagini hanno evidenziato che l'attività della COX-2 è esaltata in corso di patologie infiammatorie del polmone. I metaboliti della via metabolica COX-2 dipendente possono avere attività pro- od anti-infiammatoria; pertanto, non è semplice stabilire in che modo le PG possono intervenire nelle fasi di inizio, progressione e risoluzione del danno.

In conclusione, i risultati delle nostre indagini dimostrano che le vie enzimatiche 5-LOX e COX-2 dipendenti vengono esaltate entrambe nelle patologie infiammatorie del polmone e che gli eicosanoidi verosimilmente contribuiscono in modo significativo alla patogenesi delle stesse.

## BIBLIOGRAFIA

Ackermann M.R. (2007) "Acute inflammation". In: "Pathologic Basis of Veterinary Disease", 4<sup>th</sup> Edit., McGavin M.D., Zachary J.F., Eds., Mosby Elsevier, USA pp. 101-152.

Brockmeier S.L., Halbur P.G., Thacker E.L. (2002) "Porcine respiratory disease complex". In: "Polymicrobial Diseases", Brodgen A., Guthmiller J.M., Eds, ASM Press, USA pp. 231-258.

Castro M., Morgenthaler T.I., Hoffman O.A., Standing J.E., Rohrbach M.S., Limper A.H. (1993) "Pneumocystis carinii induces the release of arachidonic acid and its metabolites from alveolar macrophages". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 9, 73-81.

Cho W.S., Chae C. (2002) "Immunohistochemical detection of cyclooxygenase-2 in lungs of pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*". Journal of Comparative Pathology 127, 274-279.

Cho W.S., Chae C. (2003) "Expression of cyclooxygenase-2 in swine naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*". Veterinary Pathology 40, 25-31.

Cho W.S., Chae C. (2004) "Expression of nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase-2 in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*". Veterinary Pathology 41, 666-672.

Coffey M.J., Phare S.M., George S., Peters-Golden M., Kazanjian P.H. (1998) "Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils". Journal of Clinical Investigation 102, 663-670.

Coffey M.J., Phare S.M., Peters-Golden M. (2004) "Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils". Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids 71, 185-190.

Ford-Hutchinson A.W., Bray M.A., Doig M.V., Shipley M.E., Smith M.J. (1980) "Leukotriene

B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes". *Nature* **286**, 264-265.

Hennet T., Ziltener H.J., Frei K., Peterhans E. (1992) "A kinetic study of immune mediators in the lungs of mice infected with influenza A virus". *Journal of Immunology* **149**, 932-939.

Hopkins H., Stull T., Von Essen S., Robbins R., Rennard, S. (1989) "Neutrophil chemotactic factors in bacterial pneumonia". *Chest* **95**, 1021-1027.

Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Mitchell R.N. (2007) "Acute and chronic inflammation". In: "Robbins Basic Pathology", 8<sup>th</sup> Edit., Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Mitchell R.N., Eds., Saunders Elsevier, USA pp. 31-58.

Lewis R.A., Austen K.F., Soberman R.J. (1990) "Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human disease". *New England Journal of Medicine* **323**, 645.

Locksley R.M., Fankhauser J., Henderson W.R. (1985) "Alteration of leukotriene release by macrophages ingesting *Toxoplasma gondii*". *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* **82**, 6922-6926.

Marruchella G., Giacomini-Stuffler R., Baffoni M., Maccarrone M. "5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in porcine parasitic bronchopneumonia: Immunohistochemical and biochemical investigations". *Journal of Comparative Pathology*, in press.

Peters-Golden M., Canetti C., Mancuso P., Coffey M.J. (2005) "Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses". *Journal of Immunology* **174**, 589-594.

Peters-Golden M., Henderson W.R. (2007) "Leukotrienes". *New England Journal of Medicine* **357**, 1841-1854.

Tager A.M., Bromley S.K., Medoff B.D., Islam S.A., Bercury S.D., Friedrich E.B., Carafone A.D., Gerszten R.E., Luster A.D. (2003) "Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment". *Nature Immunology* **4**, 982-90.

Talvani A., Machado F.S., Santana G.C., Klein A., Barcelos L., Silva J.S., Teixeira M.M. (2002) "Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection". *Infection and Immunity* **70**, 4247-4253.