

RUOLO DEGLI ORMONI SESSUALI MASCHILI NELLO SVILUPPO DELLA PERITONITE INFETTIVA FELINA (FIP)

MAGGIOLINO ELENA

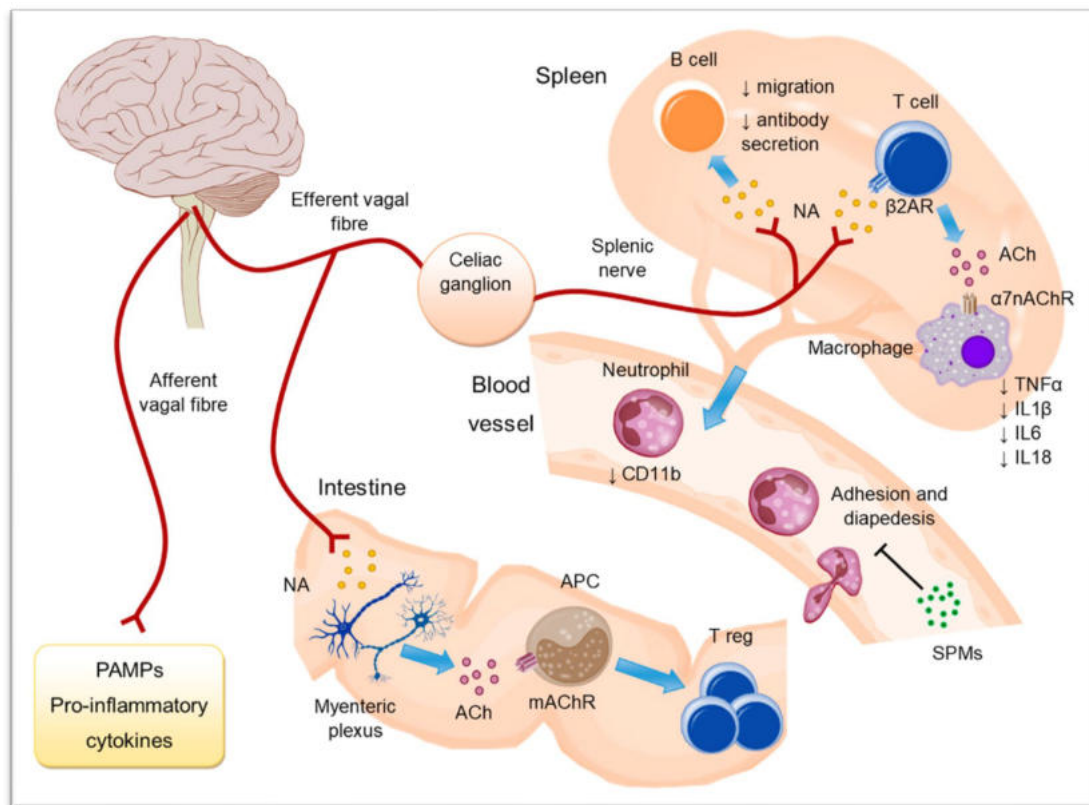
La Peritonite Infettiva Felina (FIP) è una grave malattia del gatto causata dal Coronavirus Felino (FCoV), un virus a RNA appartenente al genere *Alphacoronavirus*. Questo virus presenta due patotipi: il virus enterico (FECV), solitamente asintomatico o che porta ad una lieve enterite e localizzato a livello degli enterociti e il virus della FIP (FIPV), che replica a livello dei monociti e dei macrofagi. I macrofagi, infatti, risultano essere una parte fondamentale nello sviluppo dell'infezione. Diversi studi hanno suggerito che la mutazione di FECV porta a FIPV patogeni e, di conseguenza, il tropismo per monociti/macrofagi causa la malattia, portando a tipici danni immunopatologici. I mutanti FECV che raggiungono il biotipo FIP hanno quindi acquisito tropismo per i macrofagi. Questo tropismo alterato consente al virus di allontanarsi dalla sua normale cellula ospite, rappresentato dall'epitelio intestinale maturo e di diventare un patogeno sistemico dei macrofagi, un tipo di cellula che è al centro sia dell'immunità innata che di quella adattativa. Si ritiene che il tipo e l'intensità delle risposte immunitarie a questa infezione dei macrofagi determinino se un gatto si ammalerà o meno e, in caso affermativo, la forma che assumerà.

Questa patologia presenta diversi fattori di rischio, tra cui lo stato di salute, la razza, lo stress, l'ambiente, l'età, il sesso e lo stato riproduttivo dei soggetti. Lo studio da noi svolto, ha voluto concentrare l'attenzione su un tema non ancora particolarmente approfondito, ovvero come il sesso e lo stato riproduttivo influiscano sullo sviluppo della malattia. Si pensa infatti che ci possa essere una prevalenza di insorgenza della FIP per i soggetti di sesso maschile, soprattutto interi; tuttavia, i meccanismi con cui questo accade non sono ancora chiari. Da diversi studi condotti sia in umana durante la pandemia da Sars-CoV2 che su modelli murini, emerge che i maschi risultano essere più immunocompromessi rispetto alle femmine. In particolare si afferma che gli androgeni possono smorzare la risposta immunitaria, il che potrebbe potenzialmente aumentare la moltiplicazione del virus, aumentando così il rischio di mutazioni del genoma virale che si ritiene causino la FIP. Di conseguenza, le influenze ormonali sull'immunità cellulo-mediata potrebbero svolgere un ruolo chiave nello sviluppo della FIP, spiegando la predisposizione dei gatti maschi interi osservata in numerosi studi. In alternativa, i geni legati al sesso potrebbero essere potenzialmente responsabili per predisporre i gatti maschi alla FIP.

Diversi studi hanno messo in evidenza che i gatti affetti da FIP hanno una probabilità significativamente maggiore di essere interi, e questo vale soprattutto per i gatti maschi. Rohrbach et al. hanno osservato una sovra rappresentanza di gatti maschi interi, mentre le femmine sterilizzate erano sottorappresentate. Gli Autori hanno ipotizzato che ciò fosse probabilmente dovuto alle differenze nei modelli

comportamentali delle femmine sterilizzate rispetto ai gatti maschi sessualmente interi. Una maggiore prevalenza di gatti maschi interi con FIP è anche coerente con l'ipotesi di cui sopra, che gli ormoni steroidei sessuali, in particolare gli androgeni, influenzano negativamente l'immunità. I maschi castrati producono meno androgeni e quindi dovrebbero essere meno inclini a sviluppare la FIP.

In particolar modo, il nostro studio ha voluto studiare l'espressione del recettore nicotinico contenente subunità $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR), un recettore colinergico presente sia in cellule neuronali che non neuronali, tra cui i macrofagi. È l'elemento chiave della cosiddetta via antinfiammatoria colinergica. Questo meccanismo permette al sistema nervoso di regolare direttamente la risposta immunitaria attraverso il nervo vago. L'effetto dell'attivazione della via antinfiammatoria colinergica (CAP) da parte del recettore nicotinico contenente subunità $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) sui macrofagi può portare a una risposta molto meno grave del sistema immunitario dell'ospite, con una significativa riduzione della mortalità. L'acetilcolina (ACh) in particolar modo, si lega a livello del $\alpha 7$ nAChR, provocando una disattivazione cellulare e una



diminuzione della secrezione delle citochine infiammatorie (TNF α , IL1 β , IL6, IL18).

Gli ormoni sessuali sono importanti modulatori di questo recettore, gli androgeni infatti, sembrano diminuire l'affinità dell'acetilcolina nei confronti del recettore stesso.

Abbiamo quindi voluto indagare sul rapporto che gli ormoni sessuali hanno sull'espressione del recettore a livello macrofagico, cellula in prima linea nelle infezioni da Coronavirus felino e più nello specifico abbiamo voluto ricercare quale fosse la sua espressione in base allo stato riproduttivo.

Per questo studio abbiamo selezionato 22 campioni autoptici di gatti deceduti a causa di FIP (confermata tramite PCR o Immunoistochimica-IHC) sia maschi che femmine, interi e gonadectomizzati. Tutti i campioni erano inclusi in paraffina e provenivano in parte dal nostro archivio di anatomia patologica (Università di Camerino), in parte dalla collaborazione con i colleghi delle Università di Torino e Napoli. Gli organi selezionati presentavano lesioni tipiche della malattia, ovvero lesioni granulomatose e/o piogranulomatose. Abbiamo proceduto poi eseguendo l'analisi per Immunoistochimica sulle sezioni di organi utilizzando come anticorpo primario policlonale di coniglio $\alpha 7nAChR$ (1:300) e come anticorpo secondario un goat anti-rabbit IgY biotinilato. Al termine della tecnica abbiamo controcolorato con ematossilina di Harris.

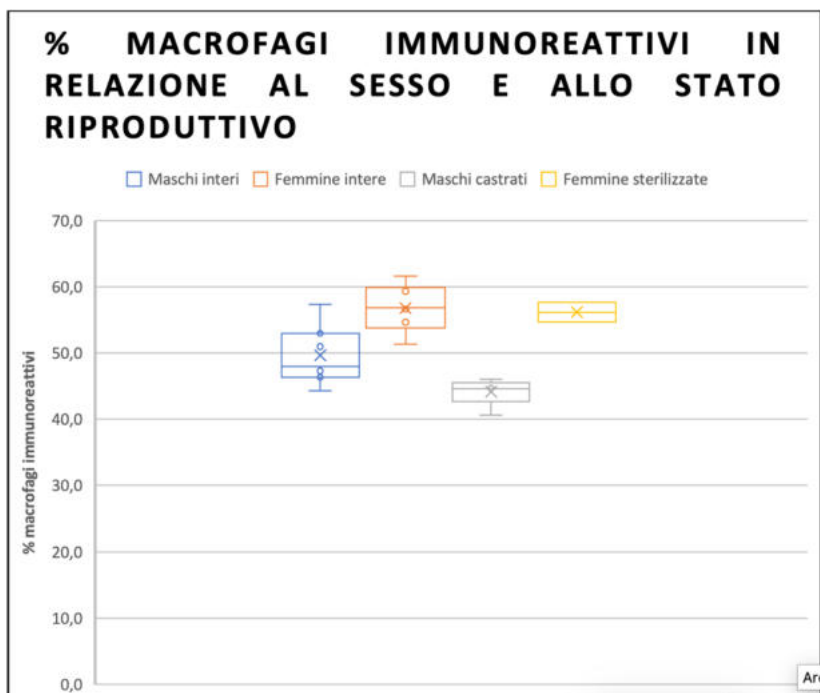
Abbiamo poi individuato le aree maggiormente rappresentative delle lesioni selezionando 3 di questi focolai infiammatori e in ciascuno dei quali abbiamo contato 100 macrofagi (all'ingrandimento 40x), classificandoli in positivi o negativi all'immunoreazione citoplasmatica per $\alpha 7nAChR$.

Dai dati ottenuti, seppur non sufficienti per effettuare un'analisi statistica, abbiamo valutato che il profilo endocrino femminile induce una maggiore espressione del recettore $\alpha 7nACh$ a livello macrofagico, rispetto al profilo endocrino maschile. Più nello specifico, si è visto che i maschi interi esprimono maggiormente il suddetto recettore rispetto ai maschi castrati (maschi interi $49,6 \pm 4,5$ e maschi castrati $44,2 \pm 2,1$) e che tra le femmine intere e le femmine sterilizzate non vi è una particolare differenza di

44,3	61,7		
47,3			

espressione recettoriale (femmine intere $56,8 \pm 3,7$ e femmine sterilizzate $56,2 \pm 2,1$), seppure non avessimo un

numero sufficientemente ampio di campioni autoptici di femmine sterilizzate tale da effettuare un confronto più accurato.



Nella **tabella 1** sono presentati i risultati in percentuale ottenuti per ciascun campione risultato positivo all'IHC effettuando la media dei 3 campi microscopici presi in considerazione e di conseguenza sottoposto a *scoring* immunoistochimico.

Nella **tabella 2** invece, sono rappresentati graficamente i dati da

noi ottenuti, ponendo in relazione le medie, il sesso e lo stato produttivo dei gatti affetti da Peritonite Infettiva Felina.

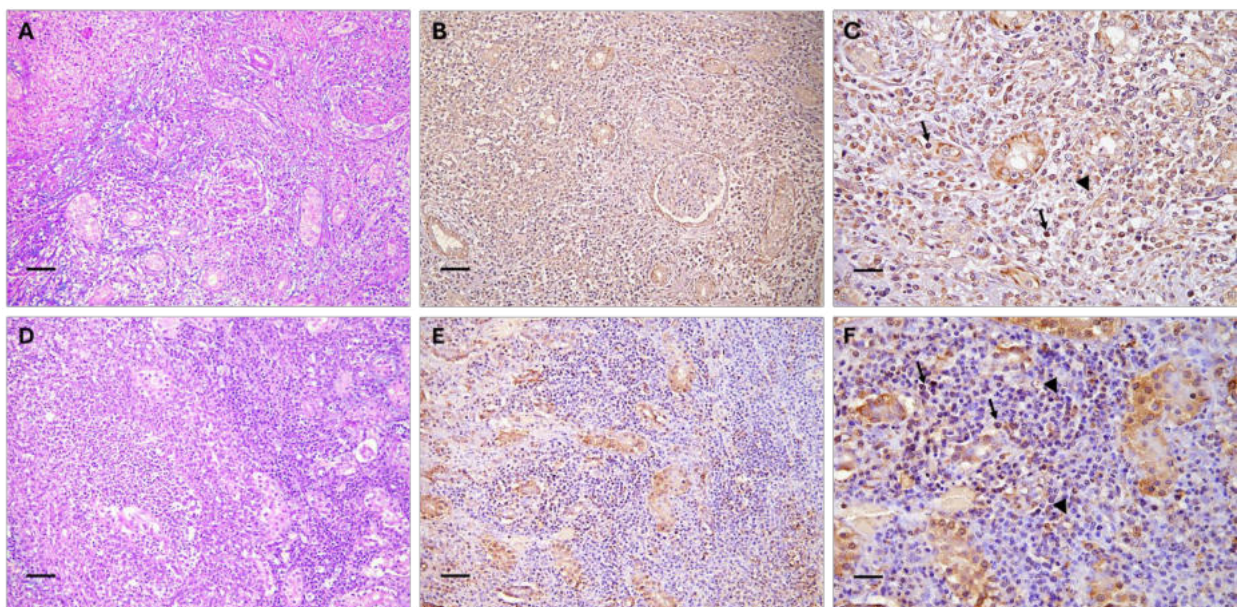
MASCHI INTERI	FEMMINE INTERE	MASCHI CASTRATI	FEMMINE STERILIZZATE
48,8	54,7	44,7	57,7
53,0	57,0	40,7	54,7
51,0	56,7	45,0	
46,3	59,3	44,7	
57,3	51,3	46,0	

Tabella 1: percentuale di macrofagi immunoreattivi nei diversi sessi e stati riproduttivi

Tabella 2. grafico rappresentativo dei macrofagi immunoreattivi in base al sesso e allo stato riproduttivo

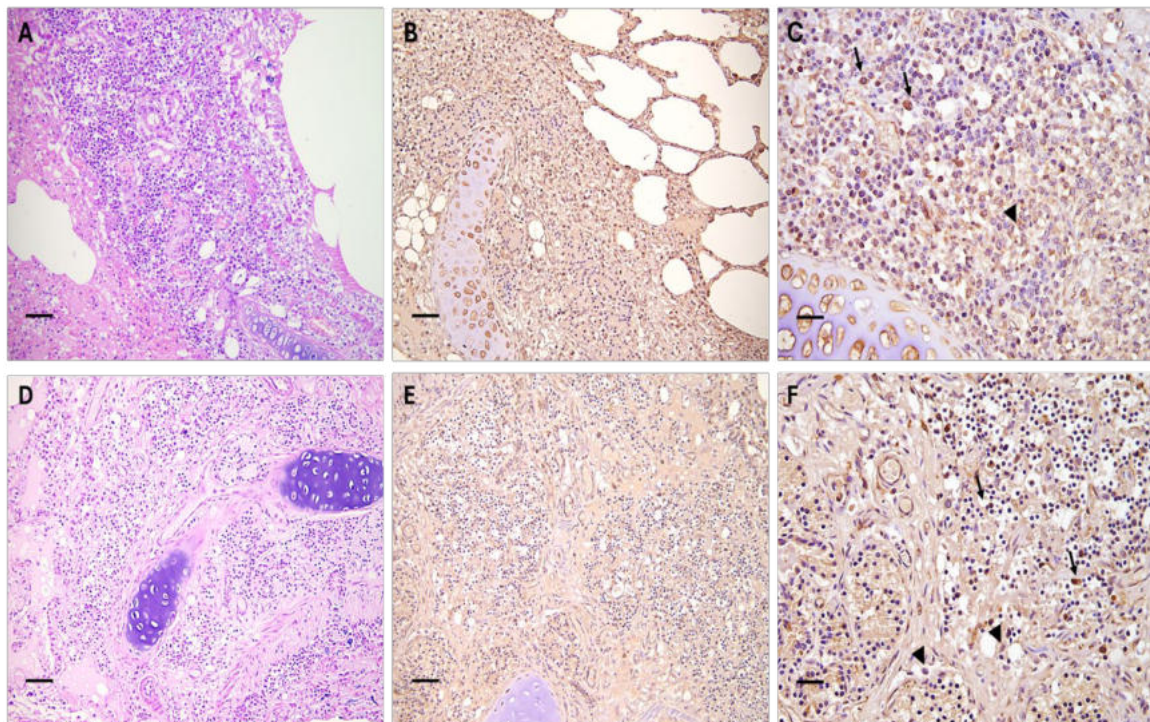
Le sezioni di tessuto selezionate per lo studio, sono state osservate al microscopio e successivamente documentate tramite acquisizione fotografica. Abbiamo in particolar modo messo in evidenza sezioni di tessuti di rene, polmone ed encefalo in cui si può notare la differenza di espressione del recettore $\alpha 7$ nACh e quindi la differenza di immunoreazione citoplasmatica a livello macrofagico, ma anche a livello linfocitario e plasmacellulare.

Immagine 1: Rene, immagini rappresentative dell'espressione del recettore $\alpha 7$ nACh da parte delle cellule macrofagiche presenti nell'infiltrato infiammatorio di due casi differenti di Peritonite Infettiva Felina. In entrambi i casi si osserva un quadro di severa nefrite interstiziale, caratterizzata da percentuali variabili di macrofagi, neutrofili, linfociti e plasmacellule. Sono inoltre presenti nuclei picnotici ed aree necrotiche multifocali (A, D). Le immagini ottenute mediante immunoistochimica mostrano come il recettore sia espresso non solo dai macrofagi presenti nell'infiltrato, ma anche da linfociti e plasmacellule, in percentuali variabili. Per l'analisi dei macrofagi è stata pertanto considerata la percentuale di cellule



macrofagiche che presentano una immunoreazione citoplasmatica positiva (freccia) rispetto a quelle in cui la reazione è assente (testa di freccia). Nel caso presentato nelle immagini A–C si osserva un quadro con maggiore positività macrofagica, rispetto al soggetto presentato nelle immagini D–F.

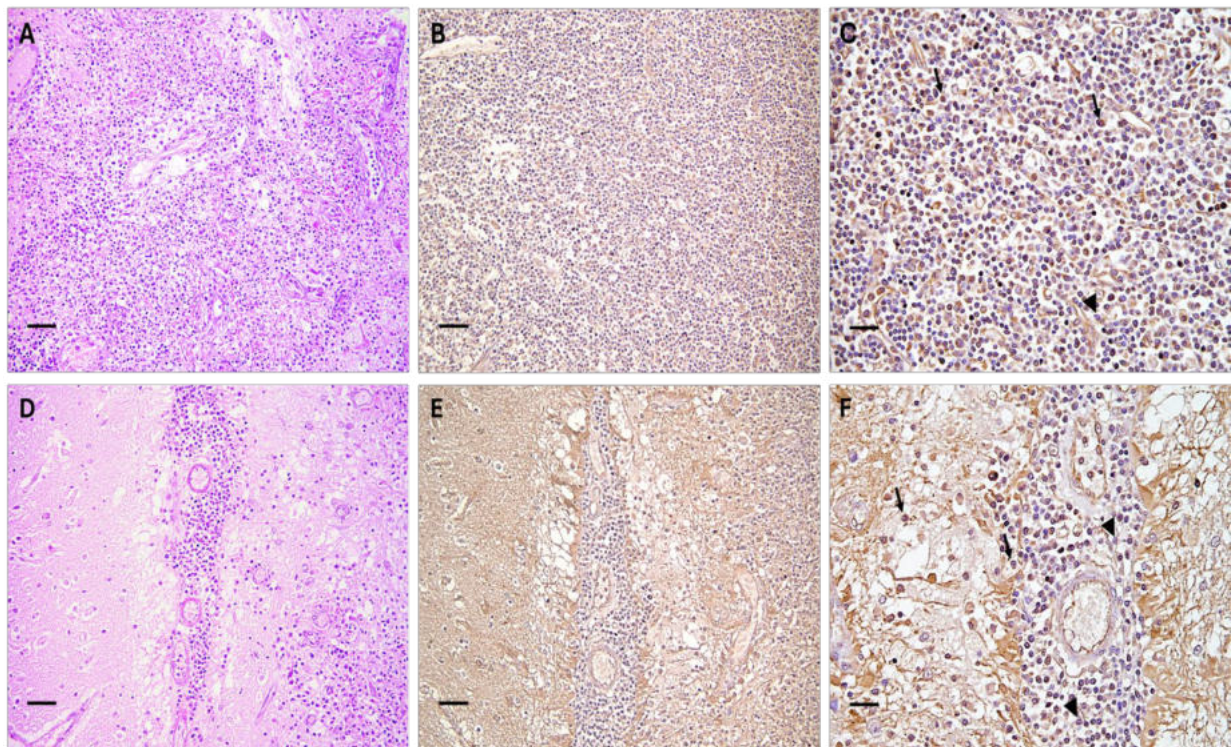
Immagine 2: Polmone, immagini rappresentative dell'espressione del recettore $\alpha 7nACh$ da parte delle cellule macrofagiche presenti nell'infiltrato infiammatorio di due casi differenti di Peritonite Infettiva Felina. In entrambi i casi si osserva un quadro di severa polmonite interstiziale, caratterizzata da percentuali variabili di macrofagi, neutrofili, linfociti e plasmacellule. Sono inoltre presenti aree di edema alveolare ed interstiziale e nuclei picnotici (A, D). Le immagini ottenute mediante immunohistochimica mostrano come il recettore sia espresso non solo dai macrofagi presenti nell'infiltrato, ma anche da



linfociti e plasmacellule, in percentuali variabili. Per l'analisi dei macrofagi è stata pertanto considerata la percentuale di cellule macrofagiche che presentano una immunoreazione citoplasmatica positiva (freccia) rispetto a quelle in cui la reazione è assente (testa di freccia). Nel caso presentato nelle immagini A–C si

osserva un quadro con maggiore positività macrofagica, rispetto al soggetto presentato nelle immagini D–F.

Immagine 3: Encefalo, immagini rappresentative dell'espressione del recettore $\alpha 7$ nACh da parte delle cellule macrofagiche presenti nell'infiltrato infiammatorio di due casi differenti di Peritonite Infettiva Felina. In entrambi i casi si osserva un quadro di severa encefalite, caratterizzata da percentuali variabili



di macrofagi, neutrofili, linfociti e plasmacellule. Sono inoltre presenti nuclei picnotici ed aree di necrosi (A, D). Le immagini ottenute mediante immunoistochimica mostrano come il recettore sia espresso non solo dai macrofagi presenti nell'infiltrato, ma anche da linfociti e plasmacellule, in percentuali variabili. Per l'analisi dei macrofagi è stata pertanto considerata la percentuale di cellule macrofagiche che presentano una immunoreazione citoplasmatica positiva (freccia) rispetto a quelle in cui la reazione è assente (testa di freccia). Nel caso presentato nelle immagini A–C si osserva un quadro con maggiore positività macrofagica, rispetto al soggetto presentato nelle immagini D–F.

Dal nostro studio emerge che il profilo endocrino femminile induce una maggiore espressione recettoriale macrofagica rispetto al profilo endocrino maschile., dato coerente con l'ipotesi iniziale.

È inoltre emerso che la castrazione nel maschio, sembra invece predisporre ad una minore espressione recettoriale a livello macrofagico, dato inatteso, in quanto pensavamo che allontanando la fonte di

testosterone (inibitorio nei confronti del sistema immunitario e nel legame dell'acetilcolina nei confronti del recettore), ci fosse una maggiore espressione recettoriale, ma così non è stato. Nelle femmine sterilizzate l'espressione varia di poco rispetto alle controparti intere. Quest'ultimo dato però può essere considerato trascurabile, data la scarsa casistica.

Questi risultati ci hanno portato quindi ad effettuare diverse considerazioni: la prima riguarda il contenuto di estradiolo, che sappiamo diminuire nei soggetti gonadectomizzati; tuttavia, bisognerebbe quantificare i livelli di estradiolo nei diversi soggetti (interi/gonadectomizzati); la seconda riguarda l'ormone luteinizzante, che sappiamo invece aumentare nei soggetti gonadectomizzati; tuttavia, non si hanno ancora dati sull'influenza di questo ormone su sistema immunitario.