



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE CLINICHE E FARMACO-TOSSICOLOGICHE VETERINARIE  
XXII Ciclo

TROMBOCITOPENIA IMMUNOMEDIATA SECONDARIA  
IN CANI NATURALMENTE INFETTI DA *LEISHMANIA INFANTUM*

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Paolo Ciaramella

Docente guida:

Ch.mo Prof. Paolo Ciaramella

Candidato:

Dott. Michele Prisco

Triennio Accademico 2006 - 2009



# INDICE

## INTRODUZIONE

- Trombocitopenia pagina 5

## PARTE GENERALE

- Citometria a flusso pagina 12
- Emostasi pagina 33
- Piastrine pagina 42
- Trombocitopenie immunomediate pagina 82
- Leishmaniosi canina pagina 94

## PARTE SPERIMENTALE

- Materiali e metodi pagina 114
- Risultati pagina 118
- Discussione e conclusioni pagina 126
  
- Bibliografia pagina 133

## INTRODUZIONE

## TROMBOCITOPENIA

La trombocitopenia è una condizione patologica nella quale si contempla una riduzione assoluta del numero delle piastrine circolanti (conta piastrinica  $\leq 150'000/\mu\text{l}$ ) (Sullivan et al., 1995): tale evenienza risulta essere di riscontro comune sia nel cane che nel gatto (Grindem et al., 1991). È considerata quale più diffuso disordine emostatico acquisito e la più frequente causa di emorragie spontanee nel cane (Couto, 1999).

Sembra, inoltre, ormai ampiamente acquisito che alcune razze di cani, quali Greyhound, Cavalier King Charles Spaniel e Shiba, abbiano normalmente un numero di piastrine circolanti inferiore alla media (Eksell et al., 1994; Sullivan et al., 1994; Smedile et al., 1997; Gookin et al., 1998).

Suddetta anomalia può derivare da un'ampia serie di condizioni patologiche, che possono essere classificate come segue:

1. ridotta trombocitopoiesi;
2. aumentata consunzione;
3. aumentata trombocitocateresi;
4. sequestro;
5. emorragia imponente.

La trombocitopenia dovuta a patologie del midollo osseo è costantemente caratterizzata da pancitopenia, bicitopenia (trombocitopenia in associazione ad anemia non rigenerativa o neutropenia) o presenza di cellule ematiche anormali o di morfologia anomale (Jain, 1993).

La specifica distruzione della sola linea megacariocitica è un evento raro: fattori come terapie farmacologiche [farmaci antinfiammatori non steroidei (fenilbutazone), antibiotici (cloramfenicolo, sulfamidici/trimethoprim), tireostatici (propiltiouracile, metimazolo)], terapie antineoplastiche [radioterapia e chemioterapia (ciclofosfamide, azatioprina, doxorubicina)], intossicazioni, infezioni di varia natura

(parvovirosi, cimurro, sepsi, ehrlichiosi, micosi sistemiche), comportano una riduzione della proliferazione di tutte le linee cellulari che hanno origine dal midollo osseo (Schmaier, 1997).

In questo ambito, è la dismegacariocitopoiesi, condizione caratterizzata da un diminuito numero di megacariociti: non infrequente, in associazione, il riscontro di *micromegacariociti* (megacariociti di dimensioni ridotte). Inoltre, da sottolineare come tale quadro possa essere anche considerato come uno stato preleucemico (Jain, 1993).

Talvolta, tale condizione può essere indotta da estrogeni, autogeni (sertolioma) o somministrati a scopi terapeutici (patologie prostatiche e/o delle ghiandole perianali) (Sherding et al., 1981; Jain, 1993).

Il ridotto numero di piastrine quale effetto di aumentata consunzione od esaltata distruzione delle stesse è occorrenza distinta in immunomediata e non. Nel novero della prima sono da ricordare la Porpora Trombocitopenica Immunomediata, Lupus Eritematoso Sistemico, filariasi, ehrlichiosi, neoplasie. Per la seconda evenienza, rivestono un ruolo di primaria importanza la Coagulazione Intravascolare Disseminata, le vasculiti (di qualsivoglia natura), la sindrome uremica emolitica, la tularemia, la leishmaniosi e la setticemia (Lewis et al., 1995).

Il sequestro piastrinico può avere luogo per differenti motivi tra cui è importante ricordare quello secondario a splenomegalia (Jain, 1993) dovuta ad emangiosarcomi (Grindem et al., 1994), malattie infettive, congestioni e/o paratopie. È stato, altresì, riportato anche come lo stato di ipotermia può rendersi, a sua volta,

responsabile di trombocitopenia, per disfunzione piastrinica ed intrappolamento dei trombociti nella trama vascolare epatica e splenica (Spiel et al., 2009).

Discernere la condizione trombocitopenica, onde risalire alle cause e provvedere ad adeguato trattamento delle stesse e designare una prognosi, comporta una visione compendiaria del paziente, della sua presentazione clinica e del background di interesse anamnestico fondato.

Indispensabile il ricorso alle metodiche di laboratorio, volto alle determinazione emocitometriche (conta eritrocitaria, conta leucocitaria con formula, conta piastrinica e valutazione di forma e volume dei trombociti e dello striscio ematico opportunamente allestito), alla definizione del profilo emocoagulativo (ovvero ottenimento dei valori del *tempo di coagulazione attivata*, del *tempo di protrombina*, del *tempo di tromboplastina parziale attivata*, dei *prodotti di degradazione della fibrina*), alla ricerca di titoli anticorpali per specifiche malattie autoimmuni (ricerca di *anticorpi anti-nucleo* per diagnosi di Lupus Eritematoso Sistemico) ed infettive (ehrlichiosi, leishmaniosi, ed altre).

In corso di leishmaniosi sono stati riportati disordini emocoagulativi quali epistassi, ematuria, ifema, diarrea emorragica, ed altri (Font et al., 1994; Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999; Ciaramella e Corona, 2003). La trombocitopenia è stata riportata nel 29.3% dei casi, in associazione a disfunzione piastrinica nella maggior parte dei soggetti infetti (Ciaramella et al., 1997, 2005; Petadines et al., 2008).

Diversi studi hanno infatti messo in evidenza che, in corso di leishmaniosi, si assiste ad un'alterazione dell'emostasi primaria e secondaria. In particolare, un'alterazione dell'emostasi secondaria è stata messa in relazione alla gravità del quadro clinico, nonché nella maggiore compromissione epato-renale, non infrequente in tale affezione (Ciaramella et al., 2005). Va inoltre segnalato, come vi sia una modificazione della funzione endoteliale nel contesto emocoagulativo, con incremento dei valori di trombomodulina, secondario a processi infiammatori (vasculiti) (Ciaramella et al., 2005).

Numerose ricerche hanno, altresì, ampiamente dimostrato un'alterazione dell'emostasi primaria: in particolare, si assiste ad alterata capacità aggregante, strettamente correlata al quadro clinico ed all'eventuale presenza di infezione da *Ehrlichia canis*. I meccanismi patogenetici alla base di tale meccanismo sono molteplici. Sicuramente un ruolo di primaria importanza è riconosciuto nella presenza di anticorpi antiplastrine, in cani naturalmente infetti da *Leishmania* (Terrazzano et al., 2006): in un recente studio sono stati infatti analizzati i sieri di 33 animali malati, nella maggior parte non trombocitopenici, attraverso l'impiego di moderne metodiche quali la citofluorimetria che, attualmente, rappresenta il *gold standard* per il rilievo di anticorpi diretti verso tali componenti ematici.

In base a tali risultati ed in prosecuzione di predetti studi, lo scopo della presente tesi è quello di indagare, mediante immunofluorescenza indiretta e citometria a flusso, se la presenza di anticorpi anti-plastrine può essere associata

all'occorrenza di trombocitopenia immunomediata in cani naturalmente infetti da *Leishmania infantum*.

Al fine di meglio comprendere quanto oggetto della ricerca, la parte sperimentale sarà preceduta da una breve disamina sulla citometria a flusso, sull'emostasi, sulle trombocitopenie immunomEDIATE e sugli aspetti eziopatogenetici e clinico-diagnostici della leishmaniosi canina.

## PARTE GENERALE

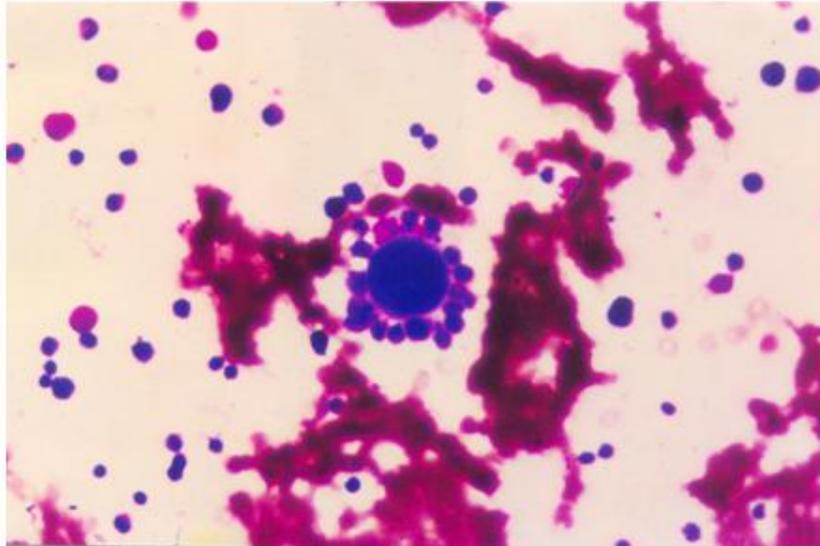
## CITOMETRIA A FLUSSO

Sono state impiegate diverse metodiche per ricercare anticorpi sierici capaci di legarsi alle piastrine: tuttavia, tali test sono in grado di riconoscere la presenza di tali anticorpi, ma non di permettere la distinzione tra condizione trombocitopenia immunomediata primaria e secondaria (Lewis et al., 1995).

Il test *PF3* (*Platelet Factor 3*) si basa sul principio per il quale le piastrine che hanno subito il legame con gli specifici anticorpi, rilasciano, a seguito del danneggiamento della membrana plasmatica, il suddetto PF3 (che induce, tra l'altro, accelerazione del tempo di tromboplastina parziale attivata: ad ogni modo, a tale test è stata riconosciuta una bassa sensibilità e specificità (Jain e Kono, 1970; Williams e Maggio-Price, 1984).

La prova di immunofluorescenza diretta sui megacariociti è un'indagine volta a ricercare le IgG legate alle membrane degli stessi, presenti a livello di midollo osseo (Joshi e Jain, 1976): è stata riportato anche un peculiare fenomeno che può

indirizzare verso una diagnosi porpora trombocitopenia, ovvero la formazione di *rosette* di linfociti T adese alla superficie dei megacariociti stessi (Mathew e Goel, 2009).



*Rosetta* di linfociti intorno ad un megacariocita.

La sensibilità di tale esame nei soggetti con trombocitopenia immunomediata è variabile: dal 30 all'80% (Joshi e Jain, 1976). La necessità di eseguire tale metodica su campioni di midollo, la rende inadeguata per pratiche di routine.

Negli ultimi anni, si è sviluppata e resa sempre più specializzata la *Citofluorimetria (CFM)*, tecnica capace di svelare con attendibilità e sensibilità elevate la presenza di anticorpi antiplastrine.

La comparsa della CFM avviene intorno alla fine degli anni sessanta (Kamentsky et al., 1965; van Dilla et al., 1985) e determina un veloce ed intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche, dando così un impulso decisivo soprattutto agli studi sulla proliferazione cellulare.

Fin dall'inizio della sua creazione, mediante la CFM ci si prefigge lo scopo di misurare proprietà multiple di singole cellule ad una velocità così rapida da permettere una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa. Tuttavia, se l'esigenza iniziale è stata quella di automatizzare l'analisi del DNA per estenderla ad un grandissimo numero di cellule rispetto alle tecniche tradizionali (fotometria, fluorimetria), in seguito l'applicazione migliore diviene quella sui campioni ematologici, che per la loro natura ben si prestano a questo tipo di indagine.

Inizialmente la CFM era limitata alla misura di uno o due parametri: generalmente un parametro per la misura fisica del *light-scattering* (tecnica di spettroscopia ottica che, attraverso lo studio della diffusione di determinate lunghezze d'onda, permette di avere informazioni su forma, dimensioni e dinamica delle particelle) e l'altro per *fluorescenza*. La strumentazione era caratterizzata da varie sorgenti di eccitazione. Usando questi primi strumenti equipaggiati con laser ad ioni Argon, fu perfezionato anche lo studio del sistema immune. Tipicamente gli immunologi si avvalsero di antisieri e *anticorpi monoclonali* (*Monoclonal Antibodies, MoAb*) marcati con isotiocianato di fluoresceina (*fluorescein isothiocyanate, FITC*) (Mathew e Goel, 2009).

Risultò presto evidente che molti MoAb avevano reazioni sovrapposte con vari *subsets* cellulari. Questo, aggiunto alla complessità del sistema immune, rivelata dall'uso di questi MoAb diretti contro *antigeni (Ag)* di superficie linfocitaria, stimolò sia lo sviluppo di MoAb sempre più specifici, sia la ricerca di nuovi coloranti

fluorescenti e di tecniche per coniugarli a tali Ab, nonché di citometri a flusso multiparametrici più sensibili.

Il problema principale fu quello di trovare coloranti che potevano essere coniugati agli Ab senza che venisse modificata la loro capacità di legame e di selezionare *fluorocromi* con spettri distinti di emissione.

I primi sistemi in CFM a doppia fluorescenza impiegarono Ab coniugati con fluoresceina e *rodamina*, ma ne risultava una sovrapposizione spettrale considerevole. Il problema fu superato con la sintesi di *derivati della rodamina*, quali il *Texas-red*, colorante impiegato con successo in combinazione con il FITC, anche se erano necessarie due sorgenti di eccitazione, rispettivamente a 600 e 488 nm.

Un punto di svolta nella CFM fu lo sviluppo di coloranti quali le *ficobiliproteine*: tali fluorocromi naturali sono solubili in acqua, a pH neutro, facilmente coniugabili con MoAb ed hanno rese quantiche molto elevate. Uno di questi, la *ficoeritrina (PE)*, viene eccitata dalla stessa lunghezza d'onda del FITC (488 nm), pertanto può essere usata insieme ad esso per realizzare un sistema di rilevazione molto sensibile e riproducibile in doppia marcatura.

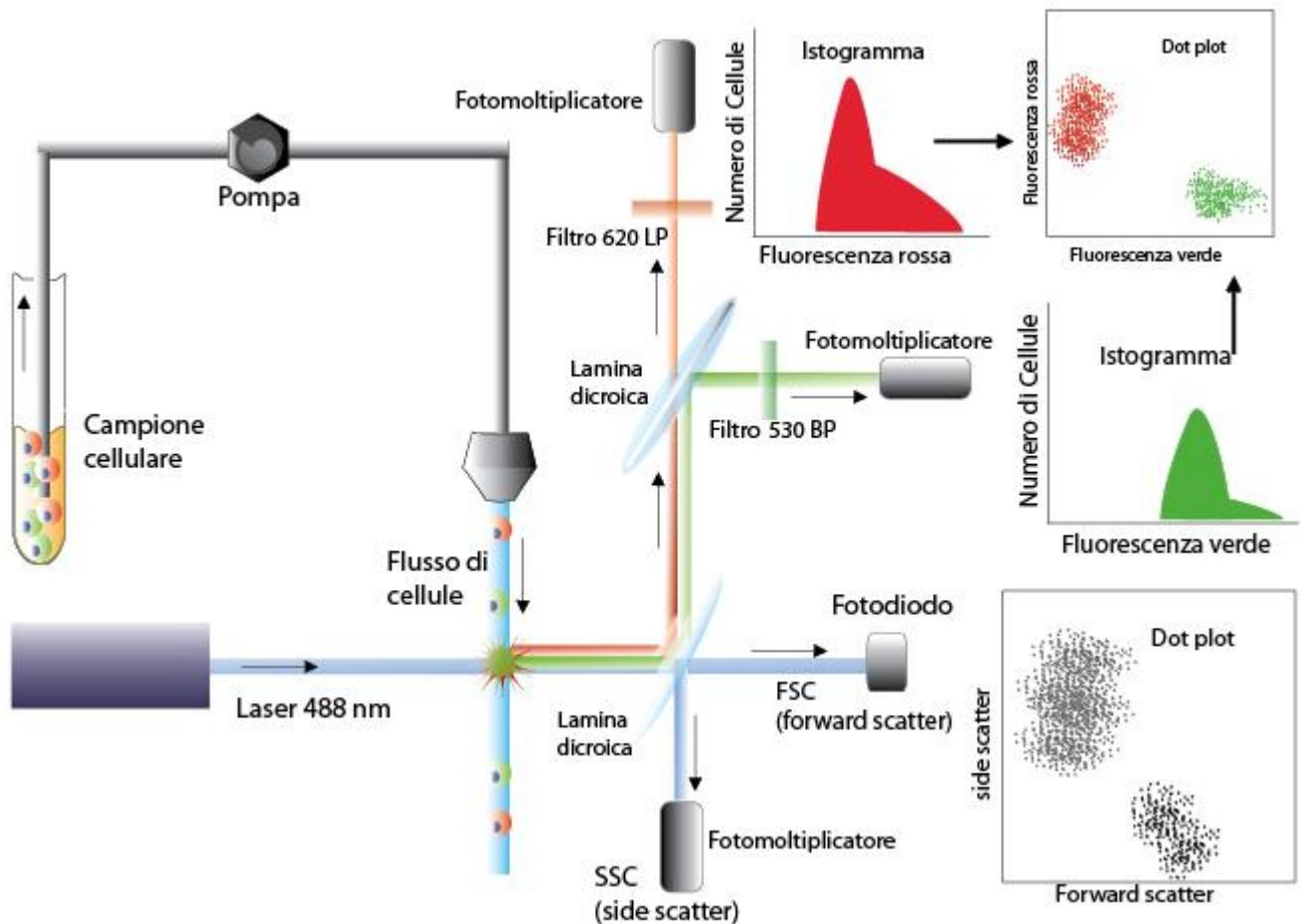
La CFM raggiungerà il suo culmine di diffusione negli anni '80. Molti dei fattori limitanti la sua iniziale capillarizzazione sono da attribuire per primo ad un elevato costo e complessità strumentale, per secondo alla relativa difficoltà metodologica ad ottenere risultati di sufficiente qualità, come nel caso dei tessuti solidi per la determinazione del DNA. D'altra parte ricerche sia metodologiche che tecnologiche hanno consentito la soluzione di buona parte di questi problemi,

rendendo disponibili commercialmente strumenti sempre più dedicati ad applicazioni specifiche con costi contenuti e prestazioni molto avanzate (Fulwyler, 1974; Martinez-Osorio et al., 2009).

A questo, attualmente, può aggiungersi la disponibilità di MoAb marcati con fluorocromi e diretti contro una larghissima varietà di Ag di membrana e/o intracellulari, che identificano la linea cellulare, la composizione in sottopopolazioni, il livello di differenziazione e le caratteristiche associate alla proliferazione, così come l'espressione di Ag aberranti, inclusi i prodotti virali, e degli oncogeni. Si può certamente affermare che la CFM può oggi spaziare in diversi campi, dalla immunologia all'oncologia, dalla citogenetica alla botanica.

La Citometria, in relazione al metodo di preparazione dei campioni, che deve essere sempre in forma di sospensione cellulare monodispersa, si distingue in Citometria a flusso (CFM) e *Citometria statica o per immagine (ICM)*.

Nei citometri a flusso, sospensioni cellulari (come pure di nuclei, cromosomi ed altri materiali biologici) vengono iniettate in un filetto liquido, il quale tende, in condizioni idrodinamiche opportune, a trasportare le cellule in maniera separata ed ordinata in un punto in cui arriva un fascio di luce focalizzata (De Santis et al., 2009).



Citometria a flusso.

Al contrario per i citometri statici (analizzatori per immagine) l'elemento cellulare o il particolare elemento biologico viene prima visualizzato dall'operatore (generalmente tramite l'ausilio di un microscopio) e poi analizzato.

Per quanto riguarda sia la citometria a flusso che la statica, la finalità è quella di misurare parametri biofisici e biochimici per poi raccogliergli nella memoria di un microprocessore, rappresentarli graficamente mediante opportuni software e analizzarli con metodi statistici.

Con i moderni citometri a flusso per applicazioni clinico-laboratoristiche si possono misurare simultaneamente diverse proprietà cellulari, senza per questo dover ricorrere a strumenti con doppio /triplo raggio di eccitazione.

L'analisi multiparametrica è uno dei più potenti aspetti di questa strumentazione necessaria per affrontare i problemi biologici della eterogeneità cellulare tramite due operazioni fondamentali: il *gating* ed il *sorting* (Martínez-Osorio et al., 2009).

Il *gating* è impiegato per trarre pieno vantaggio dall'analisi a più dimensioni: ad esempio, una popolazione può, in base a determinati parametri (analisi bidimensionale), essere isolata con l'aiuto di una "finestra elettronica" e quindi permettere la misura di altri due parametri, che la suddividono ancora in altre popolazioni. Il *cell-sorting*, che è un *gating* fisico, consente invece di raccogliere fisicamente la popolazione in una provetta separata.

Nella ICM la componente strumentale dispone di unità del tipo di quella a flusso, senza dispositivi necessari a focalizzare oggetti in movimento. È potenzialmente automatizzabile come, per esempio, per la ricerca di cromosomi in metafase. Mediante l'uso di coordinate cellulari è possibile eseguire misure multiple successive sulle stesse cellule, eventualmente trattate con metodiche diverse. Si possono così ottenere dati autoradiografici tramite l'uso di precursori radioattivi e poi utilizzare la *reazione di Feulgen* per la colorazione specifica del DNA.

In generale i diversi metodi microscopici sono ugualmente utilizzabili e intercambiabili in successione. Pertanto le informazioni che si otterranno potranno

essere molto dettagliate in relazione alla concentrazione di alcune molecole e alla loro posizione spaziale (Mathew e Goel, 2009).

Con i citometri statici, dunque, si possono acquisire parametri ad alta risoluzione, legati alla geometria, densitometria e struttura di unità e subunità cellulari.

Dall'indagine morfologica qualitativa si possono ottenere informazioni di valido aiuto nei casi di eterogeneità cellulare dei tumori, potendo discriminare cellule linfocitarie da cellule epiteliali, stromali, infiammatorie, ed altro. È chiaro che tutte queste informazioni non saranno in certi casi di immediato significato, per cui si richiederanno elaborazioni matematiche e statistiche (Fulwyler, 1974; Van Dilla et al., 1985).

Questo oggi è possibile data la disponibilità di microcomputer ad elevata potenza di calcolo che permettono di sviluppare programmi di analisi molto complessi. Nella ICM l'immagine fornita da un microscopio ottico, eventualmente automatizzato nelle sue funzioni di *focusing* e movimento del carrello, viene inviata tramite telecamera a un convertitore analogico digitale, quindi a un computer che la visualizza su un monitor ad alta risoluzione con le relative elaborazioni. Per le sole misure di assorbimento si può impiegare una telecamera standard, mentre per le misure di fluorescenza sono necessarie telecamere ad alta sensibilità.

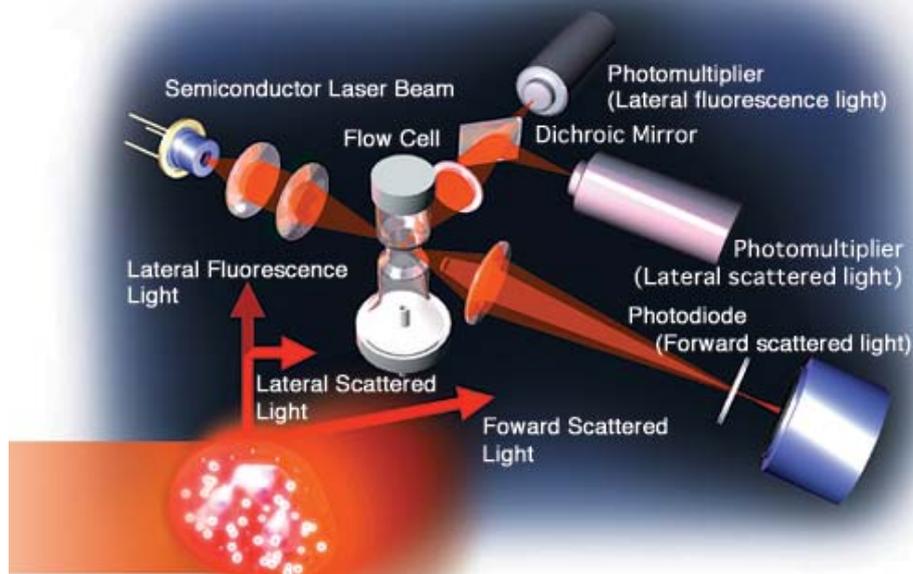
La citometria statistica è sicuramente destinata ad un notevole sviluppo, sia nel senso della elaborazione dei dati, sia per quanto riguarda il campo evolutivo della microscopia (a laser, a scansione, ed altro).

Per confrontare i due tipi di citometria, è da considerarsi il semplice e comune esempio di cellule infiammatorie, stromali e tumorali presenti in un campione ottenuto da un tumore solido e preparato per una misura citometrica del DNA.

Mediante la ICM i linfociti o le cellule diverse da quelle tumorali possono essere facilmente riconosciute, morfologicamente, per l'interazione con un operatore.

Questo risulta essere un problema seriamente limitante nella CFM, in quanto i parametri di morfologia *FSC* (*Forward Scatter*) verso *SSC* (*Side Scatter*) sono a bassa risoluzione e non sempre consentono di separare cellule di istotipo diverso. Ciò comporta che i valori generalmente ottenuti per le cellule neoplastiche in fase S (a meno di una separazione preliminare di cellule tumorali da quelle stromali e infiammatorie) non siano corretti (Mathew e Goel, 2009; Martínez-Osorio et al., 2009).

Un secondo esempio può riguardare l'analisi di cellule molto rare, che in CFM non sono separabili dal rumore di fondo, a causa del loro ridotto numero in confronto alla massività dell'analisi. Esse possono essere visualizzate e misurate correttamente in ICM. Le limitazioni all'impiego della CFM trovano anche altre giustificazioni, quali la necessità di dover lavorare con campioni in fase monodispersa e l'impossibilità di localizzare la sede di provenienza di un segnale, in caso di contemporanea presenza di marcatori nei diversi compartimenti cellulari.



Citometro a flusso: *forward e side scatter*.

Gli svantaggi della ICM consistono nei lunghi tempi di misura e nel ridotto numero di cellule esaminate e quindi in dati statisticamente meno affidabili.

Tra i vantaggi della CFM sono da evidenziare: la possibilità di analisi multiparametrica, l'elevato numero di cellule esaminate (oltre 50'000), l'obiettività, la riproducibilità e l'affidabilità statistica delle letture, la rapidità dei tempi di analisi (oltre 1000 cellule/sec), nonché la semplicità di processazione dei campioni da esaminare, evitando lunghe e complesse procedure di purificazione, senza per questo perdere la vitalità cellulare (cell-sorting).

I citometri a flusso a raggio laser consentono inoltre misure molto sensibili dell'ordine di 300-400 molecole di *fluoroforo*/cellule: ridurre la sensibilità è un evento possibile ma nello stesso tempo rischioso, perché può risultare poi difficile separare l'oggetto della misura da artefatti tecnici.

Questo non si verifica per la ICM in quanto è l'operatore che ha un controllo visivo su tutto quanto è misurato (Mathew e Goel, 2009).

Si ricorda che i citometri per immagine a tecnologia avanzata hanno la possibilità di permettere la misura di circa 100 fluorofori, purché questi si trovino condensati in una nube tale da dare una sorgente puntiforme.

Il principio di funzionamento di un citometro a flusso può essere così riassunto: il citometro permette la misurazione rapida della luce deviata e della fluorescenza emessa da cellule opportunamente illuminate. Le cellule, o le particelle, sono sospese in un mezzo liquido e producono segnali quando attraversano un fascio di luce.

La luce diffusa e la fluorescenza emessa da ciascuna particella sono raccolte da specifici dispositivi opto-elettronici, che le convertono in segnali analogico-digitali, ed inviate ad un computer, ove la distribuzione del segnale viene rappresentata con istogrammi di frequenza o citogrammi, facendo riferimento a differenti parametri. La luce diffusa nella stessa direzione della luce incidente è collegata alla dimensione della cellula (Forward Scatter, FSC), mentre la luce diffusa con un angolo di 90° fornisce informazioni relative alla complessità strutturale della particella (Side Scatter, SSC) viene convogliata da un sistema fluidico di trasporto fino al punto di misura. Qui incontra un fascio luminoso focalizzato di alcune decine di micron, tramite l'ausilio di una lente proveniente da una sorgente di eccitazione. Quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare (*stream*) vengono generati segnali dall'incontro di ogni singola cellula. Questi segnali sono legati alle caratteristiche fisiche della particella (diametro, rapporto nucleo/citoplasma, granularità interna,

rugosità di membrana), e alla presenza di molecole fluorescenti localizzate in diversi siti. Una volta emessi, i segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi diecrici e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (*fotodiodi* e *fotomoltiplicatori*) che ne misurano l'intensità (Mathew e Goel, 2009; Valtriani e Hurle, 1997).

Questi segnali elettrici (analogici) provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, associati tra loro, sono inviati a un analizzatore/elaboratore di dati che provvede alla presentazione su un monitor dei medesimi e alla loro definizione statistica.

Nella sua forma più semplice, pertanto, un citometro a flusso è la combinazione di un sistema di dispensazione di un campione liquido con uno spettrofluorimetro ed un fotometro a light scatter. Partendo da un campione consistente in una sospensione cellulare (o di altre particelle) il sistema di dispensazione del campione liquido fornisce un mezzo conveniente ed efficiente per presentare individualmente le cellule del campione alla stazione di misura.

Nei citometri con raggio laser, usati per indagini cliniche laboratoristiche, viene impiegata per la maggior parte dei casi una sorgente luminosa ad ioni Argon, di potenza variabile dai 15 m Watt a 5 Watt, centrata su una lunghezza d'onda di 488 nm (blu). Questo particolare consente una efficace misura dei parametri fisici, nonché una contemporanea eccitazione di differenti fluorocromi (fino a tre insieme). La sorgente ad ioni Argon ha un costo elevato, ma più contenuto rispetto ad altre forme di eccitazione laser, e permette inoltre l'emissione di un ridotto numero di lunghezze d'onda (514, 488 e 345 nm solo nelle versioni più potenti). È chiaro, quindi, che

qualora si vogliono utilizzare altre lunghezze d'onda occorrerà impiegare altri tipi di laser quali: Krypton, Elio Neon, Elio Cadmio, ed altri; oppure combinazioni dei medesimi con lievitazione dei costi di produzione e gestione (Valtriani e Hurle, 1997).

Si può capire quindi come il laser ad ioni Argon sia egregiamente utilizzato con riga di emissione a 488 nm, per applicazioni basate sull'impiego di fluorocromi quali il FITC in combinazione con PE.

Per le analisi sul DNA si può utilizzare l'una o l'altra fonte di eccitazione, potendo in questo caso la lampada a scarica eccitare tutti i fluorocromi utilizzabili per la marcatura citochimica del DNA.

Ciò significa che per l'analisi del DNA, potrebbero essere utilizzati sistemi di CFM dal costo contenuto, con prestazioni di elevata sensibilità.

La cellula, colpita dal fascio luminoso focalizzato, emette per prima cosa segnali di luce diffusa relativi alle sue caratteristiche fisiche e morfologiche, per fenomeni fisici di rifrazione, riflessione (Side Scatter) e diffrazione (Forward Scatter).

La geometria dell'unità ottica di raccolta dei segnali di fluorescenza e diffusione della luce *scatterata*, è profondamente influenzata dal tipo di sorgente luminosa utilizzata: nei citometri a raggio laser si utilizza una geometria "ortogonale" in quanto le direzioni del fascio di luce di eccitazione, del flusso cellulare (stream) e dell'asse ottico della lente di raccolta della fluorescenza sono mutualmente perpendicolari. Il raggio laser, intercettando lo stream, fa sì che la maggior parte della

luce incidente sia dispersa nel piano contenente il raggio di luce. Questa radiazione, che rappresenterebbe un disturbo per le misure, è di fatto bloccata da barrette di oscuramento.

Laser	Excitation Laser Line (nm)	Fluorescence channel	Band Pass (nm)	Fluorochrome
Argon	488	FL1 Green	530/30	FITC, Alexa-488, GFP
		FL2 Yellow	585/42	PE, PI
		FL3 Red	695/40	PE-Cy 5.5, PerCP-Cy5.5
UV	351-364	FL4	424/44	DAPI
Argon	488	FL1 Green	530/30	FITC, Alexa-488, GFP
		FL2 Yellow	585/42	PE, PI
		FL3 Red	678, 679	PerCP, PE-Cy5, Cy-Ch, PerCP-Cy5.5
		FL4 Infra Red	780	PE-Cy7
		FL5 Orange	613	PE-Texas Red
HeNe	633	FL6 Red	660/20	APC, Cy5, Alexa-647
		FL7 Infra Red	780/60	APC-Cy7
		FL8 Far Red	700	Alexa 700
Argon	488	FL1 Green	525	FITC, Alexa-488, GFP
		FL2 Yellow	575	PE, PI
		FL3 Orange	620	PE-Texas Red
		FL4 Red	675	PE-Cy 5.5, PerCP-Cy5.5

Citometria a flusso: esempio di gamma di laser, lunghezze d'onda e fluorocromi.

La luce dispersa in avanti entro piccoli angoli (forward scatter), legata essenzialmente alla “grandezza” cellulare, è raccolta da un sensore chiamato fotodiode e il suo contributo alla emissione di fluorescenza si può pensare trascurabile.

La luce raccolta a 90° (side scatter) è invece dovuta sia a fenomeni di dispersione che alla emissione di fluorescenza dei fluorocromi legati all'unità cellulare e sue frazioni. Il segnale correlato ai fenomeni di riflessione e rifrazione, è

da attribuire a parametri di morfologia cellulare come: granulosità citoplasmatica, rapporto nucleocitoplasma, rugosità di superficie e diametro (side scatter o scatter a ampio angolo).

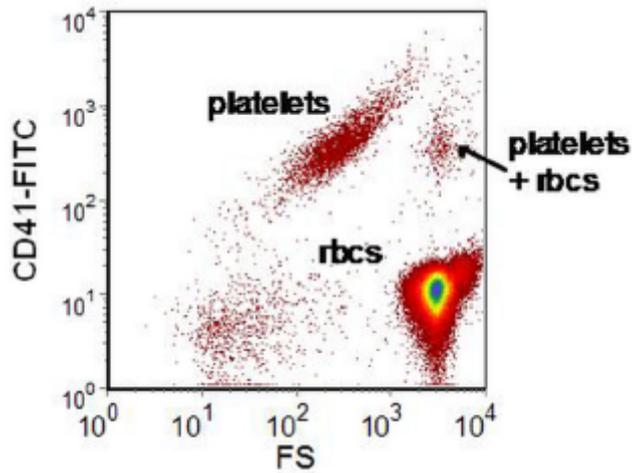
Questa luce, è sottoposta ad una analisi spettrale (separazione delle varie componenti a diversa lunghezza d'onda con l'ausilio di specchi diecrici e filtri ottici), quindi raccolta da fotomoltiplicatori, in quanto trattasi di emissioni molto meno intense rispetto al segnale di forward scatter.

Dalla combinazione dei due tipi di segnali si ottiene un particolare diagramma bidimensionale detto "citogramma", nel quale è possibile rilevare diverse popolazioni cellulari (fino a 4-5), in base alle sole loro caratteristiche fisiche.

Mediante l'uso della CFM e della fluorescenza è possibile evidenziare diverse strutture cellulari.

Molte molecole a significato antigenico o recettoriale sulla membrana, nel citoplasma, nel nucleo, possono essere messe in evidenza con ligandi fluorescenti, antisieri policlonali o MoAb, prodotti quest' ultimi secondo la tecnica degli ibridomi, marcati con fluorocromi quali, per esempio, il FITC, PE, TexasRed, ed altri.

Altre sostanze, come il DNA, RNA, proteine, ioni citoplasmatici, organuli, possono venir colorati con fluorocromi che si legano ad esse in maniera stechiometrica. Ogni fluoroforo presenta una caratteristica banda di lunghezza d'onda per l'eccitazione e l'emissione.

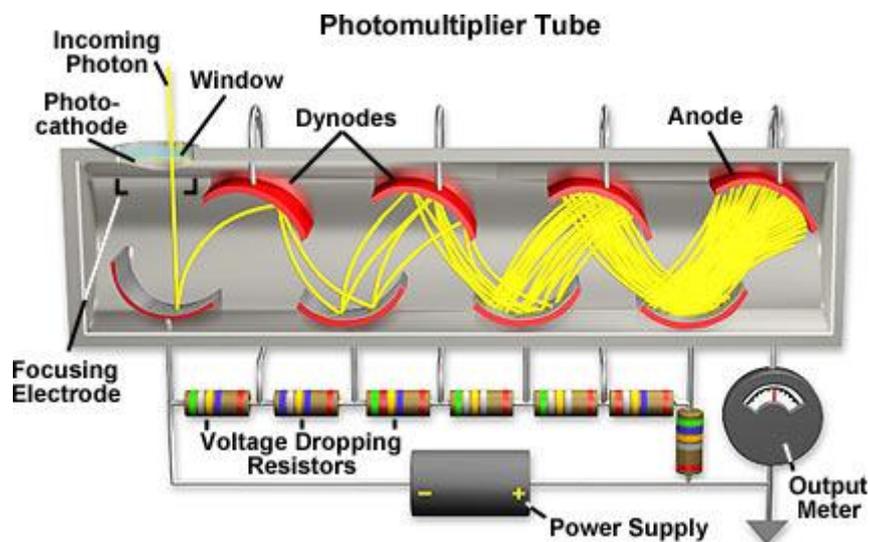


Citogramma: piastrine, eritrociti (rbc's), aggregati piastrine-eritrociti.

La lunghezza d'onda della sorgente di eccitazione costituisce, perciò, un limite alla scelta dei fluorocromi da impiegare in singolo od in combinazione. In quest'ultimo caso si deve essere anche certi che le loro bande di emissione siano sufficientemente diverse tra loro, in modo da poter essere facilmente separate con filtri ottici e misurate ciascuna da un proprio fotomoltiplicatore.

I filtri ottici, in funzione delle loro caratteristiche, si possono classificare mediante dei numeri che ne indicano la lunghezza d'onda di taglio, nonché attraverso sigle che ne definiscono la capacità di eliminare o trasmettere specifiche bande di colore. Anche i fotomoltiplicatori hanno una loro banda ottimale di risposta.

Nonostante questo sofisticato sistema di selezione di lunghezze d'onda, può succedere che ad un dato *tubo fotomoltiplicatore* (*photomultiplier tube, PMT*) possa giungere una radiazione luminosa di non trascurabile intensità, di colore indesiderato a causa dell'eccessiva ampiezza di banda di emissione del fluorocromo usato e delle caratteristiche dei filtri ottici.



Tubo fotomoltiplicatore.

A tal problema si ovvia con un sistema di correzione elettronica dei segnali definito “compensazione”. Questo ha lo scopo di sottrarre elettronicamente dal canale rosso, PE, una quota fissa di segnale relativo alla lettura parassita del verde, FITC, e viceversa. Pertanto “compensazione” è uguale a sottrazione.

Allo scopo può evocarsi la “regola” delle 4 “F”: la compensazione deve essere fatta con strumento perfettamente allineato e rimane Fissa per quella data combinazione di Fluorocromi, per quel dato set di Filtri e per quella data regolazione dei Fotomoltiplicatori (verde e rosso per FITC e PE).

Qualsiasi cambiamento di questi parametri richiede un aggiustamento della compensazione. Infine è da sottolineare che esistono cellule od altri elementi non marcati con alcun fluorocromo, i quali presentano una debole ma misurabile fluorescenza di fondo: fenomeno definito “autofluorescenza”. In caso di marcature che determinano debole intensità di colorazione, l’autofluorescenza costituisce il vero fattore limitante il potere risolutivo dello strumento.

I segnali inviati dai sensori, proporzionali in maniera continua alle dimensioni del parametro misurato, vengono trasformati dai PTM e fotodiodi in impulsi elettrici.

Questi ultimi devono, a loro volta, essere amplificati in modo da avere massimi di picco di qualche Volt (generalmente tra 0 e 10 V) in forma lineare o logaritmica.

Per i segnali di fluorescenza, che in alcune applicazioni possono variare in un campo di intensità molto ampio, è necessario disporre di preamplificatori logaritmici che consentono di esaltare segnali a bassa intensità e di comprimere quelli ad intensità elevata, permettendo, quindi, di analizzare campi di variazione molto ampi senza pericolo di *overflow*.

Gli impulsi amplificati sono tuttavia ancora inadatti per essere elaborati da un computer, essendo del tipo analogico, cioè varianti in maniera continua nel tempo: si rende così necessaria la loro conversione in segnali digitali, effettuata da un convertitore analogico digitale. Questa operazione considera il valore di picco, ovvero il massimo valore assunto dal segnale, corrispondente all'istante in cui la cellula si trova perfettamente centrata sul punto di osservazione e quindi completamente illuminata dalla luce di eccitazione. La conversione analogico-digitale sarà associata, così, agli impulsi un numero prestabilito di valori discreti a seconda del numero di canali di cui dispone. Ogni singolo valore parametrico, una volta amplificato e digitalizzato, costituisce un "quanto" citometrico, cioè un evento dell'esperimento condotto.

Quando i segnali superano i valori soglia impostati dall'operatore l'elettronica

strumentale considera l'evento" come realmente avvenuto. La visualizzazione dei segnali è di solito effettuata tramite un oscilloscopio; dalla loro forma è possibile capire se il sistema ha problemi di funzionamento delle varie unità che lo compongono.

L'elaborazione dei dati, infine, è affidata a un computer detto "analizzatore multicanale" (*multichanal analyzer, MCA*) che provvede alla loro rappresentazione mono o multiparametrica in tempo reale su un display video.

L'MCA è collegato ad un computer *general purpose* che effettua la memorizzazione dei dati su supporti magnetici: nei citometri di ultima generazione tuttavia le funzioni dell'MCA sono sostituite direttamente dal personal computer che svolge l'elaborazione dei dati in tempo reale.

La rappresentazione più semplice di un dato citometrico è un istogramma in cui gli eventi accumulati nei vari canali danno un diagramma di distribuzione: l'ascissa riporta una scala discreta della grandezza misurata legata ai livelli (canali) forniti dal convertitore e l'ordinata il numero di cellule (eventi). Solitamente è rappresentato l'involuppo della sommità degli istogrammi.

L'analisi statistica si basa sull'impostazione di un certo numero di cursori che delimitano aree di particolare interesse di indagine e sulla enumerazione degli eventi che cadono tra un cursore e l'altro. Di ogni picco o *moda* è possibile calcolare dati statistici come: valore medio, *deviazione standard (SD)*, *coefficiente di variazione (CV)* e *canale modale (CM)*.

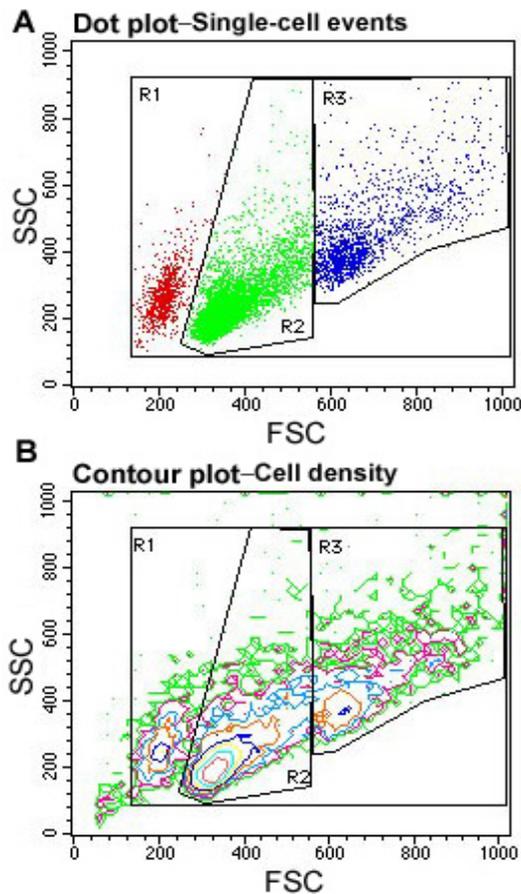
Altra rappresentazione è quella detta bidimensionale a parametri correlati, il cui diagramma definito “dot-plot” fa sì che un punto rappresenti un evento contato, dotato di un definito valore correlato ai parametri misurati.

Il *dot-plot* però ha un limite rappresentativo dato dal fatto che, occupati tutti i punti disponibili di una certa area, l’arrivo di un nuovo evento non sarà in grado di produrre alcuna variazione visuale.

Per ovviare a questo inconveniente sono stati sviluppati altri diagrammi capaci di dare maggiori informazioni: i *contour-plot*, o *diagrammi a contorni*, rappresentanti un perfezionamento del dot-plot, poichè visualizzano aree aventi la stessa densità di probabilità mediante linee concentriche, paragonabili a quelle isoaltimetriche di mappe geografiche.

La selezione elettronica delle cellule da esaminare, *gate*, è una caratteristica molto importante dei citometri a flusso; permette, ad esempio, di isolare particolari sottopopolazioni cellulari in base a determinati parametri, per poi valutare per esse altre caratteristiche che altrimenti resterebbero mascherate dalla presenza delle restanti sottopopolazioni.

Tipico esempio pratico del *gate* si ha nell’isolamento di eventi reali, dovuti alle singole cellule, da quelli spuri dovuti ad agglomerati, mediante la misura dello scatter, eliminando così l’influenza dei segnali di questi ultimi da quelli reali.



Linfociti B a livello splenico: dot plot (A) e contour plot (B).

La CFM si è sviluppata rapidamente in anni recenti, in aree molto differenti della medicina in quanto capace di fornire misure accurate, rapide, sensibili e oggettive di un ampio range di caratteristiche cellulari.

L'ematologia, e l'immunologia, rappresentano una delle aree emergenti più importanti, per la quale la CFM è idealmente adattabile allo studio di leucociti, globuli rossi e piastrine, in quanto, il sangue è una sospensione "naturale" di cellule monodisperse e c'è un numero sempre più crescente di aspetti clinicamente rilevanti della fisiopatologia di queste cellule, che possono essere vagliate con tale tecnica.

## EMOSTASI

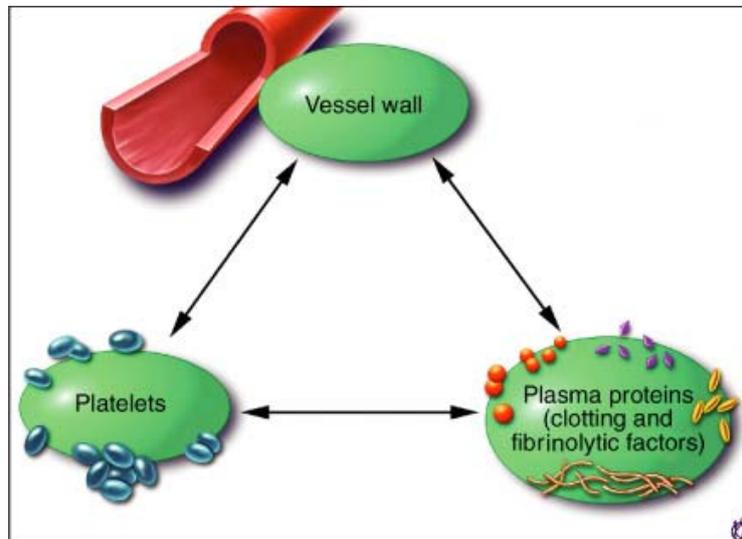
L'emostasi risulta provvedere, in condizioni ordinarie, in maniera propria alla coagulazione del sangue, per arrestare il flusso ematico e prevenire il dissanguamento in ogni tempo e luogo si verifichi un danno dell'integrità endoteliale ((Loscalzo e Schaffer, 2003; Zipes et al., 2007).

L'emostasi assolve, altresì, al ripristino del flusso e della perfusione sanguigna, a seguito della riparazione di un vaso danneggiato (Rosenberg ed Aird, 1999).

I principali componenti del sistema emostatico comprendono la stessa parete vasale, le proteine plasmatiche (fattori della coagulazione e fattori della fibrinolisi), le piastrine e, probabilmente, anche altri elementi figurati del sangue, quali monociti e globuli rossi (Shantsila e Lip, 2009; Pivkin et al., 2009).

Le cellule endoteliali derivano dagli emoangioblasti, raccolti nelle isole sanguigne, precursori dei vasi sanguigni, nel sacco vitellino dell'embrione (Loscalzo

e Schaffer, 2003). Gli emoangioblasti si differenziano sia in cellule endoteliali primitive (angioblasti) che in cellule emopoietiche (Kubo ed Alitalo, 2003).



Vasi, piastrine, proteine plasmatiche.

I progenitori endoteliali che nascono dagli emoangioblasti possono formare nuovi vasi sanguigni (*angiogenesi*) sotto l'influenza di fattori di crescita delle cellule endoteliali e dei loro *recettori tirosina-chinasi*, nonché di altri recettori e rispettivi *ligandi* (Carmeliet, 2003).

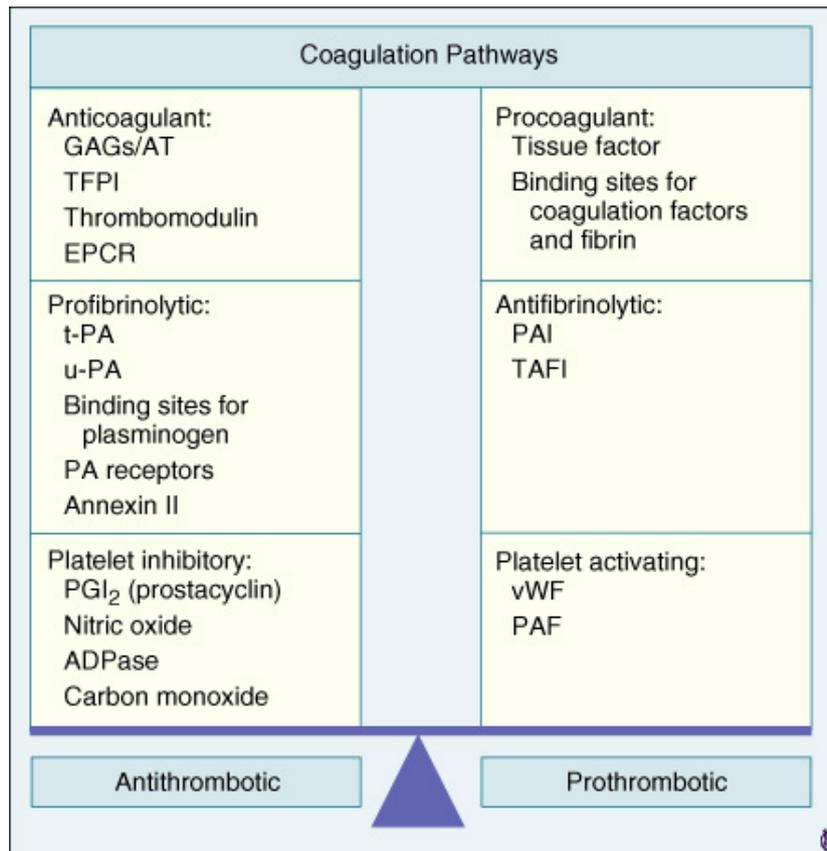
I precursori endoteliali possono di fatto circolare nel circolo sanguifero ed il loro numero può aumentare qualora sia presente un'evidente angiogenesi ai fini di rivascularizzare tessuti ipossici ed/od ischemici, traumatizzati, neoplastici, od in preda ad altri diversi stati patologici. I progenitori endoteliali sono immessi nel circolo ematico da angioblasti di derivazione midollare, nonché per distacco dei primi dalle pareti vascolari (Carmeliet, 2003).

L'endotelio è un “organo” dinamico con complesse capacità metaboliche, inclusa quella di controllare la permeabilità vascolare, il flusso di nutrienti e molecole biologicamente attive, le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice all'interno della parete vasale, il flusso ematico ed il tono vasale, le interazioni tra le cellule ematiche, la risposta infiammatoria e l'angiogenesi: l'endotelio è anche un regolatore ideale dell'emostasi (Schafer, 1997).

L'endotelio normale, quiescente, rappresenta, costitutivamente, una potente superficie antitrombotica per il flusso sanguigno: esso esercita attività anticoagulante, profibrinolitica e di inibizione dell'attività piastrinica.

Questi fenomeni, tuttavia, non sono perfettamente uniformi per l'intero sviluppo del sistema ematico; perfino nell'ambito di un singolo organo, vi è una marcata eterogeneità nel fenotipo delle cellule endoteliali: le caratteristiche fenotipiche di specificità per un singolo letto vascolare possono rendere conto della natura distintamente focale della trombosi, nonostante anomalie sistemiche dell'emostasi (Rosenberg ed Aird, 1999; Edelberg et al., 2001).

L'eterogeneità della funzione endoteliale dipende sia da fattori genetici che ambientali. L'esposizione a differenti stimoli del microambiente, compresi le variabili forze emodinamiche, la composizione della matrice extracellulare ed i mediatori cellulari ed umorali, contribuisce alla costituzione dei differenti “pattern” funzionali vascolari nell'intera rete circolatoria.

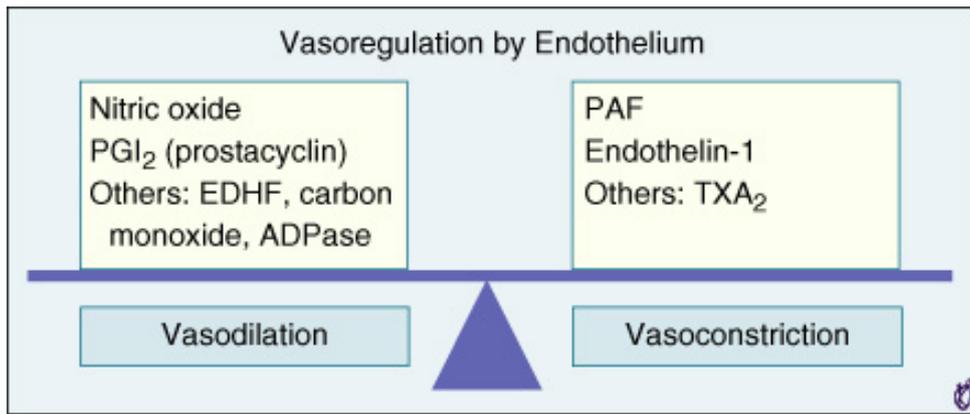


Coagulazione: fattori antitrombotici e protrombotici

La funzione emostatica della parete vasale è indotta da un danno meccanico o da un perturbamento ed attivazione delle cellule endoteliali da parte di agenti quali citochine, tossine batteriche, ipossia e flussimetria (Edelberg et al., 2001).

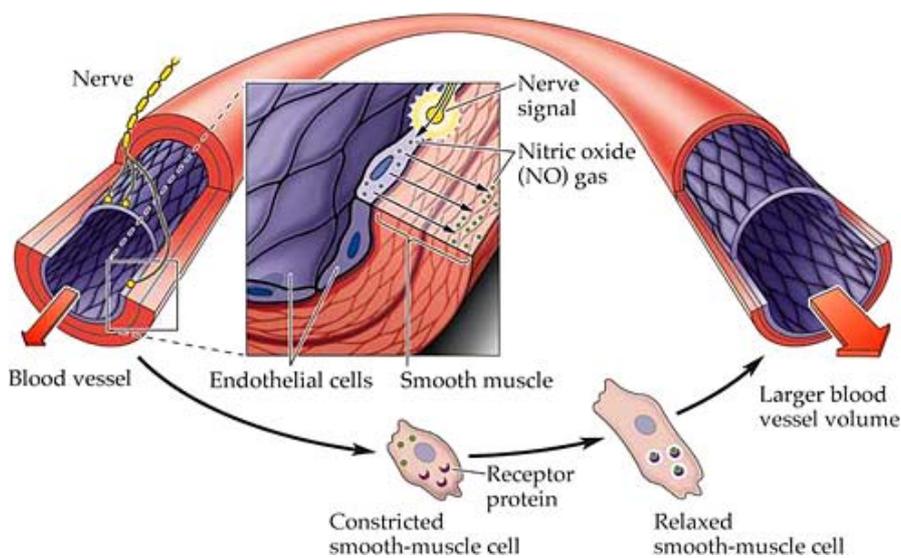
Allo stesso modo, esiste un delicato equilibrio nella capacità delle cellule endoteliali di modulare il tono vascolare.

Un importante vasodilatatore fisiologicamente rilasciato dalle cellule endoteliali è l'ossido nitrico (NO), un gas sintetizzato a partire dagli atomi di azoto dei terminali guanidici della L-arginina per azione di un gruppo di enzimi noti come *ossido nitrico-sintetasi* (NOS, *Nitric Oxide Synthases*).



Endotelio: fattori vasodilatatori e vasocostrittori.

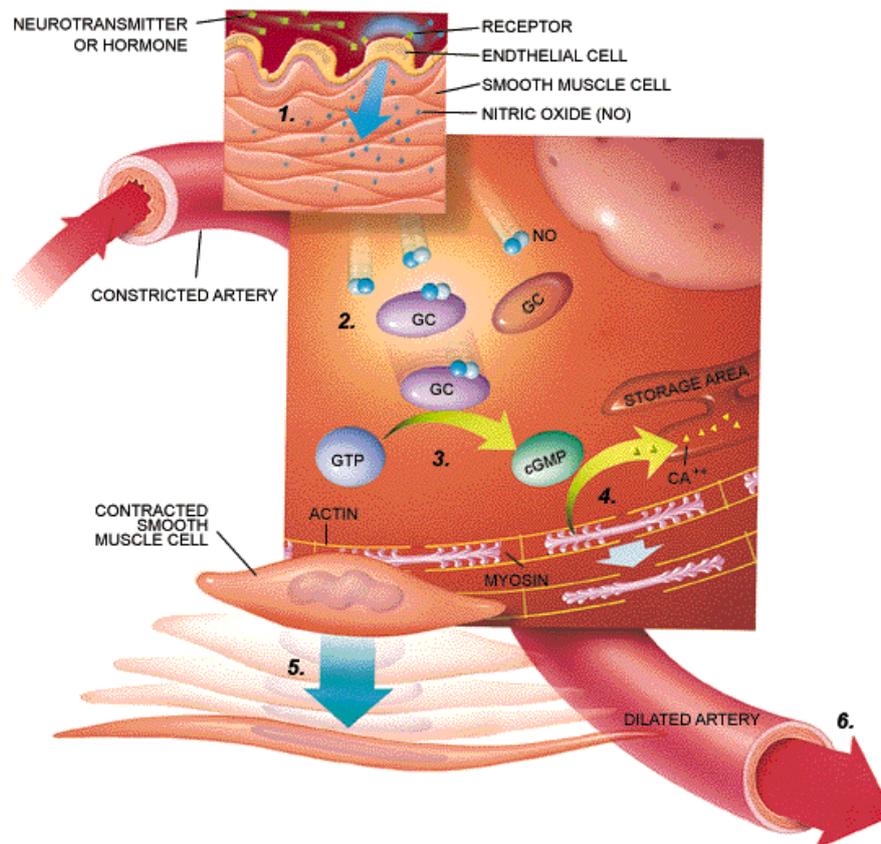
La principale isoforma di NOS presente nelle cellule endoteliali, l'*eNOS*, è attiva costitutivamente ed è ulteriormente attivata da stimoli che aumentano il calcio intracellulare, inclusi numerosi agonisti recettore-dipendenti (ad esempio, *trombina*) e le forze emodinamiche (sovraccarichi tangenziali e di stiramento ciclico) (Cook, 2003).



Endotelio ed NO.

L'NO è un efficiente vasodilatatore ed un inibitore di adesione ed aggregazione piastrinica, agendo attraverso la stimolazione della *guanilato ciclasi* solubile e quindi aumentando i livelli intracellulari del *guanosin monofosfato ciclico* nelle cellule muscolari lisce dei vasi e nelle piastrine.

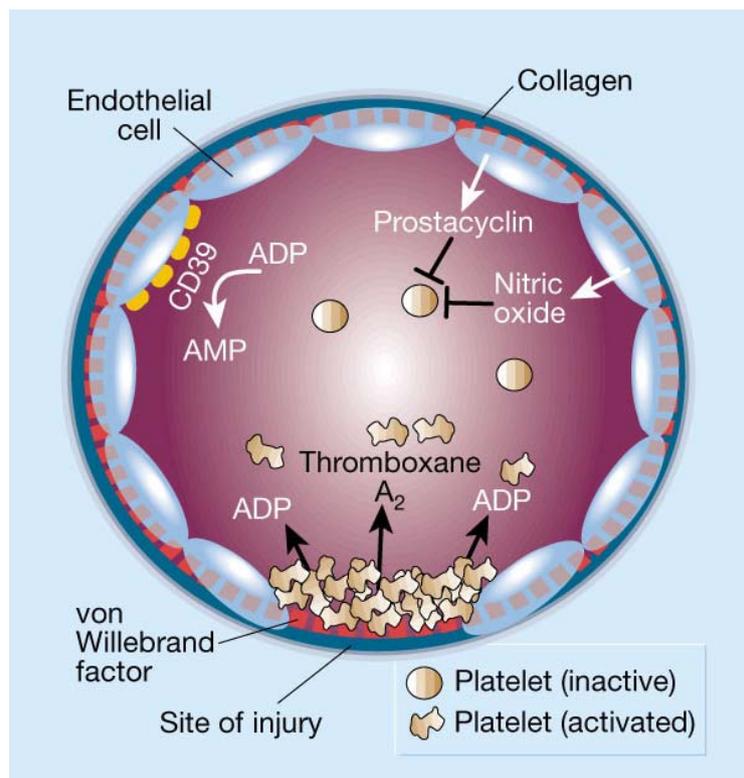
La prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>, prostaciclina) è uno dei prodotti principali dell'endotelio, derivata dall'ossidazione dell'*acido arachidonico* (AA), sintetizzata attraverso l'azione sequenziale della *ciclo ossigenasi* (COX) e della *prostaciclina sintetasi* (Davidge, 2001; Smyth e Fitzgerald, 2002).



Interazioni endotelio-piastrine.

La prostaciclina, come l'NO, è sia un vasodilatatore che un inibitore dell'aggregazione piastrinica (ma non dell'adesione) e svolge tali funzioni stimolando l'adenilato ciclasi e, di conseguenza, innalzando i livelli intracellulari di *adenosin monofosfato ciclico* ( $AMP_c$ ) nelle cellule muscolari lisce bersaglio e nelle piastrine.

Il *fattore iperpolarizzante endoteliale* ed il *monossido di carbonio* (CO), un sottoprodotto del metabolismo dell'eme a biliverdina attraverso l'*eme ossigenasi*, sono vasodilatatori diretti elaborati dalle cellule endoteliali (Durante e Schafer, 1998; Busse et al., 2002).



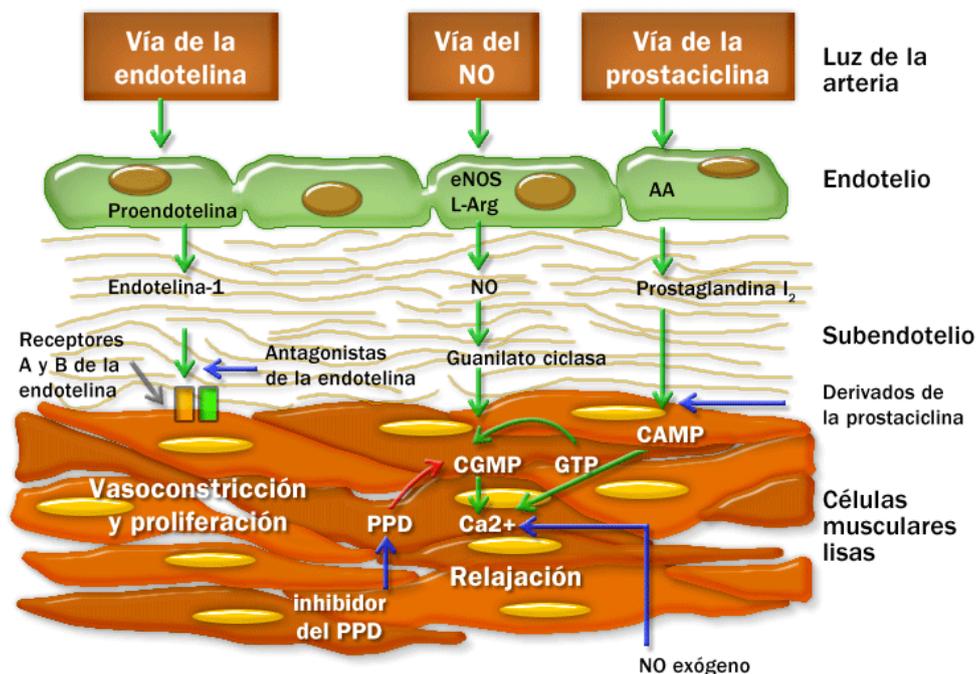
Quiescenza ed attivazione piastrinica.

L'ecto-adenosina di fosfatasi (ADPasi) endoteliale, o CD39, è un inibitore piastrinico associato alla membrana, ma può anche promuovere indirettamente una vasodilatazione, attraverso la produzione di *adenosina* (Marcus et al., 2003).

Queste proprietà vasodilatatrici dell'endotelio sono controbilanciate da vasocostrittori endotelio-derivati quali il *fattore attivante le piastrine (PAF)*, l'*endotelina-1 (ET-1)* ed il *trombossano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)* (Schiffrin, 2001; Busse e Fleming, 2003).

Spesso, i vasodilatatori endotelio-derivati sono anche inibitori piastrinici e, viceversa, i vasocostrittori endotelio-derivati possono essere attivatori piastrinici.

L'effetto complessivo della vasodilatazione e dell'inibizione della funzione piastrinica è quello di promuovere la fluidità del sangue, mentre l'effetto complessivo della vasocostrizione e dell'attivazione piastrinica è la promozione dell'emostasi.



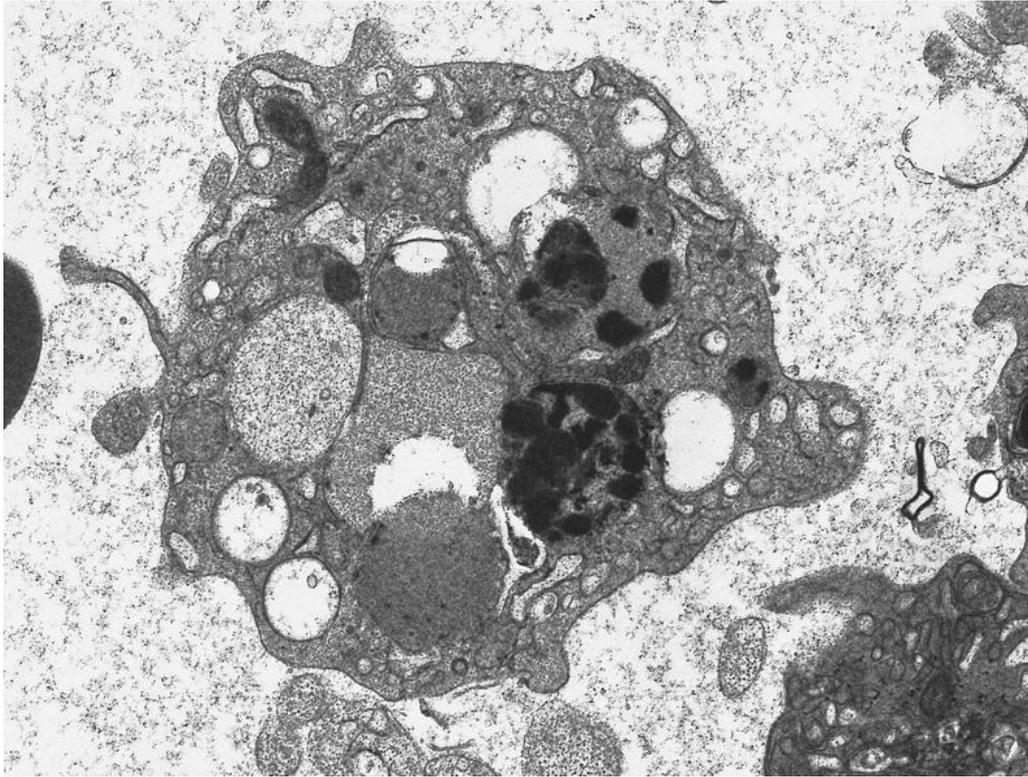
Endotelio, endotelina, NO, prostaciclina.

In questo modo, la fluidità ematica e l'emostasi possono essere finemente regolate dall'equilibrio tra le proprietà antitrombotiche/protrombotiche e vasodilatatrici/vasocostrittrici delle cellule endoteliali, che sono di frequente controllate in modo coordinato dai loro stati relativi di quiescenza ed attivazione (Carmeliet, 2003).

## PIASTRINE

Le piastrine, sono frammenti citoplasmatici, anucleati, di piccole dimensioni (2-4  $\mu\text{m}$ ) (Kaushansky, 1998), di forma discoide e con un'emivita, nel cane, di circa 5 giorni (Slichter et al., 1987), derivanti dai megacariociti (*Megakaryocytes, MK*) (20-160  $\mu\text{m}$ ), cellule di origine midollare, con nuclei lobati e citoplasma debolmente colorato (secondo tecnica Ematossilina-Eosina o May-Grunwald Giemsa) (Kaushansky, 1998): ogni MK è capace di generare migliaia di piastrine (Feldman et al., 2000). Ogni giorno, sono prodotte circa 35'000 ( $\pm$  4'000) piastrine/ $\mu\text{l}$  di sangue (Jandl J. H., 1996), mentre la normale emivita è di circa 5-9 giorni (Lewis et al. 1995; Scott, 1995).

La membrana citoplasmatica presenta, osservata dal suo versante extracellulare, delle tipiche invaginazioni, conosciute col nome di *sistema canalicolare aperto* (*Open canalicular system, OCS*) (Feldman et al., 2000).

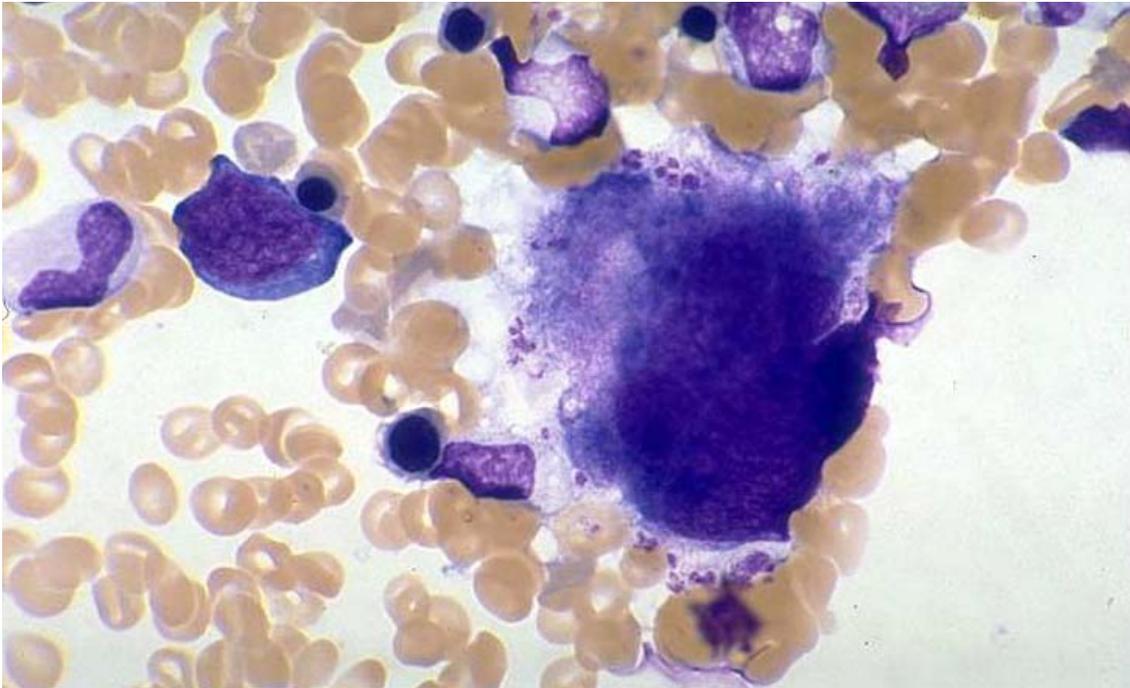


Piastrina: microscopia elettronica.

Come altre cellule emopoietiche, i MK derivano da cellule progenitrici mieloidi  $CD34^+$ , presenti nei distretti ematopoietici e nel sangue periferico (Feldman et al., 2000).

Diverse sono le linee cellulari che possono dar luogo ai MK: è stato osservato che le cellule  $CD34^+/CD38^-$  sono quelle che danno vita ad un numero maggiore di elementi progenitori primitivi, mentre le  $CD34^+/CD38^+$  contengono un'aliquota maggiore di cellule progenitrici "a breve termine" dei MK (Nichol et al., 1994; Schipper et al., 1998). A seguito della maturazione degli elementi di una data linea cellulare MK, si assiste alla perdita dell'espressione dei recettori  $CD34^+$  ed all'acquisizione di altri, quali le glicoproteine (Gp) *IIB/IIIa* e *Ib* (Debili et al., 1995): lo sviluppo dei MK è stato riprodotto *in vitro* mediante impiego di fattori di crescita cellulare quali

*interleuchina (IL) 3, IL-6, IL-11, stem cell factor (SCF), FMS-like tyrosine kinase-3 ligand e trombopoietina (TPO)* (Debili et al., 1995; Ku et al., 1996).



Megacariocita.

I MK vengono classificati in *tre stadi evolutivi*, secondo le caratteristiche morfostrutturali osservate a seguito di preparati istologici ottenuti dal midollo osseo, opportunamente allestiti e colorati secondo tecnica Wright-Giemsa (Feldman et al., 2000). Il *primo stadio* contempla cellule con diametro di 15-50  $\mu\text{m}$ , nucleo circolare od ovalare od, ancora, reniforme; il citoplasma si presenta come una banda di spessore più o meno uniforme e di circa 5  $\mu\text{m}$ , con carattere basofilo, dovuto alla presenza abbondante di ribosomi.

Il *secondo stadio* si presenta con cellule di diametro leggermente maggiore delle prime (circa 75  $\mu\text{m}$ ) e nucleo con morfologia simile; il citoplasma assume estensione maggiore, diviene policromatofilo, con presenza di granuli azzurrofilo.

Il *terzo stadio* rappresenta il MK maturo, con un diametro di circa 150  $\mu\text{m}$ , nucleo lobato e bande di cromatina a ponte tra le isole di materiale nucleare; il citoplasma ha estensione variabile, anche se comunque maggiore dello stesso del secondo stadio, nettamente eosinofilo e con numerosi granuli azzurrofilo (Metcalf et al., 1975; Levi et al., 1981; Ebbe et al., 1988).

L'aumento delle dimensioni dei MK è connesso con la progressione della loro maturazione e la ploidia: la sintesi di DNA, inoltre, e la conseguente poliploidia, diviene compiuta prima che le cellule  $CD34^+$  progenitrici possano essere riconosciute come MK (Ebbe e Stohlman, 1965).

I MK rappresentano circa lo 0.1-0.5% delle cellule eucariotiche del midollo osseo: sia le forme immature che le mature risiedono adiacenti le lacune vascolari ossee (Lichtman et al., 1978). Il citoplasma delle forme mature è tipicamente suddiviso in *tre zone*: una periferica, una intermedia ed una perinucleare.

La *zona periferica* contempla l'assenza di organuli e la presenza di microfilamenti e di particelle di glicogeno: essa è pressoché inesistente nei MK che si apprestano a dar luogo a piastrine.

La *zona intermedia*, la più rappresentata, è caratterizzata dal *sistema di membrane di demarcazione (demarcation membrane system, DMS)*, ovvero un complesso di membrane: le analogie strutturali ed immunologiche del DMS e dei

plasmalemmi delle piastrine del sangue periferico, supportano l'ipotesi che questo sia il precursore degli stessi, in seguito alla fase finale della piastrinopoiesi (MacPherson, 1972; Bentfeld-Barker e Bainton, 1977; Zucker-Franklin e Peterssen, 1984). La zona intermedia contiene anche lisosomi, ribosomi, mitocondri, microtubuli e microfilamenti (Menard et al., 1990)

La *zona perinucleare* è presenziata dall'apparato di Golgi, dal reticolo endoplasmatico ruvido e ribosomi liberi (Menar et al., 1990).

I *granuli alfa* delle piastrine originano da un precursore multivescicolare (Heijnen et al., 1998) e contiene tutte le proteine che in questi possono essere ritrovati quando all'interno dei trombociti. Tali proteine, si suppone abbiano una doppia origine: di sintesi da parte dei MK e di derivazione fagocitaria di proteine di natura extracitoplasmatica: inoltre, nei precursori MK dei granuli alfa si ritrovano anche le glicoproteine *Ib* e *IX*, *CD63*,  *$\alpha IIb\beta 3$* ,  *$\alpha v\beta 3$*  e *p-selectina* e granuli capaci di accumulare *serotonina* (Menard e Myers, 1988).

Molte delle glicoproteine di membrana delle piastrine sono contenute nelle membrane citoplasmatiche dei MK, unitamente alle *integrine*  *$\alpha 2\beta 1$* ,  *$\alpha 4\beta 1$* ,  *$\alpha 5\beta 1$* ,  *$\alpha 6\beta 1$* ,  *$\alpha IIb\beta 3$* ,  *$\alpha v\beta 3$*  e  *$\alpha v\beta 5$*  (van Pampus et al., 1992).

L'integrina  *$\alpha IIb\beta 3$* , nello specifico, può essere attivata dall'*adenosina difosfato* (*ADP*) o dalla *trombina* (così come accade nelle piastrine), consentendo un aumento dell'attività di adesione dei MK e la loro diffusione su una vasta scala di substrati: ancora analogamente alle piastrine, l'attivazione dei MK da parte degli stessi

attivatori dei trombociti, è associata al fenomeno della degranulazione e della modificazione conformazionale del citoscheletro (Feldman et al., 2000).

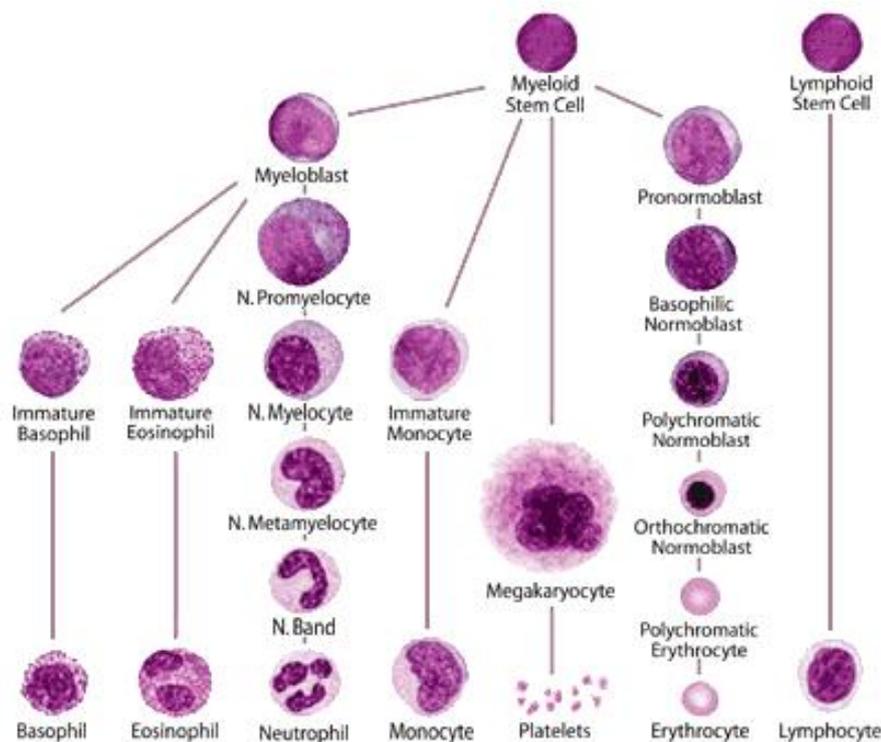
I MK maturi possiedono un'ampia rete di microfilamenti e microtubuli: l'organizzazione del citoscheletro è soddisfatta soltanto in sede subcorticale. Tali componenti filamentose hanno associate proteine quali *miosina*,  *$\alpha$ -actinina* e *proteine leganti l'actina* e possono dar luogo ad adeguamenti cellulari strutturali dei MK a seguito di opportuni stimoli per la loro attivazione (Topp e Tablin, 1991).

L'intero processo che porta alla formazione delle piastrine a partire dai megacariociti sottosta a diversi meccanismi regolatori ed a diverse tappe "evolutive", molte delle quali rimangono ancora da indagare in merito allo specifico determinismo fenomenologico (Radley e Haler, 1982; Tablin et al., 1990).

Numerosi studi condotti negli ultimi anni confermano il ruolo centrale del DMS: nello specifico, questo provvederebbe ad un importante contributo alla formazione della membrana plasmatica delle piastrine dopo l'origine degli pseudopodi megacariocitari (Radley e Haler, 1982). Gli pseudopodi vanno incontro ad una compartimentazione netta e "stagna", nella quale rimangono rinchiusi anche gli organuli che entreranno a far parte della componente corpuscolata del citoplasma piastrinico: gli pseudopodi si formeranno, inevitabilmente, per riorganizzazione della trama microtubulare e microfilamentosa del citoscheletro dei MK; in seguito si osserveranno sempre più complete coartazioni in specifici *siti di costrizione* degli pseudopodi dei MK, che daranno vita, dunque, ai trombociti (Tablin et al., 1990; Choi et al., 1995).

Da un punto di vista umorale, la regolazione della trombocitopoiesi a partire dai MK è un fenomeno che vede coinvolti numerosi fattori, anche ormonali (Di Bella et al., 1969), e di varia origine (Feldman et al., 2000).

L'SCF agisce in sinergia con l'IL-3 od il *colony-stimulating factor della linea granulocito-macrofagica (GM-CSF)* a seguito della stimolazione da parte del *colony-forming unit-MK (CFU-MK)*, influenzando la poliploidizzazione e la maturazione del citoplasma dei MK (Ebbe et al., 1973).



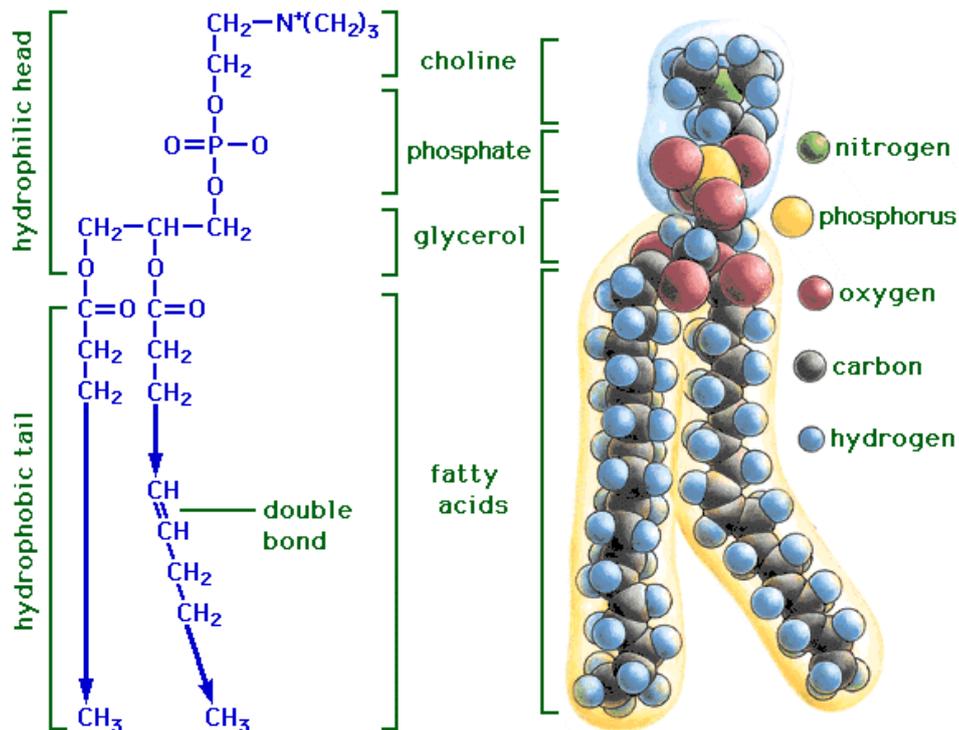
Linee cellulari mieloide e linfoide.

Di concerto ai primi, entrano nel novero dei fattori di stimolo ed *enhancing*, l'IL-6, IL-11, il *leukemia inhibitory factor (LIF)*, il *ciliar neurotrophic factor (CNTF)*, la *cardiotrofina-1* e l'*oncostatina M*.

Degna di menzione, la segnalazione ad opera di Di Bella et al. (1969) sul ruolo della *melatonina* e del *sistema abenulo-epifisario*, quali stimolanti in senso positivo, la proliferazione piastrinica.

La TPO, sintetizzata principalmente nel fegato, ma anche da reni, testicoli, cervello e nel midollo osseo e con una notevole omologia costitutiva con l'eritropoietina: la sua azione si riconosce nella promozione dello sviluppo dimensionale dei MK, della poliploidia, della formazione dei pseudopodi e del rilascio di piastrine pronte ad assolvere alle loro funzioni (Choi, 1997).

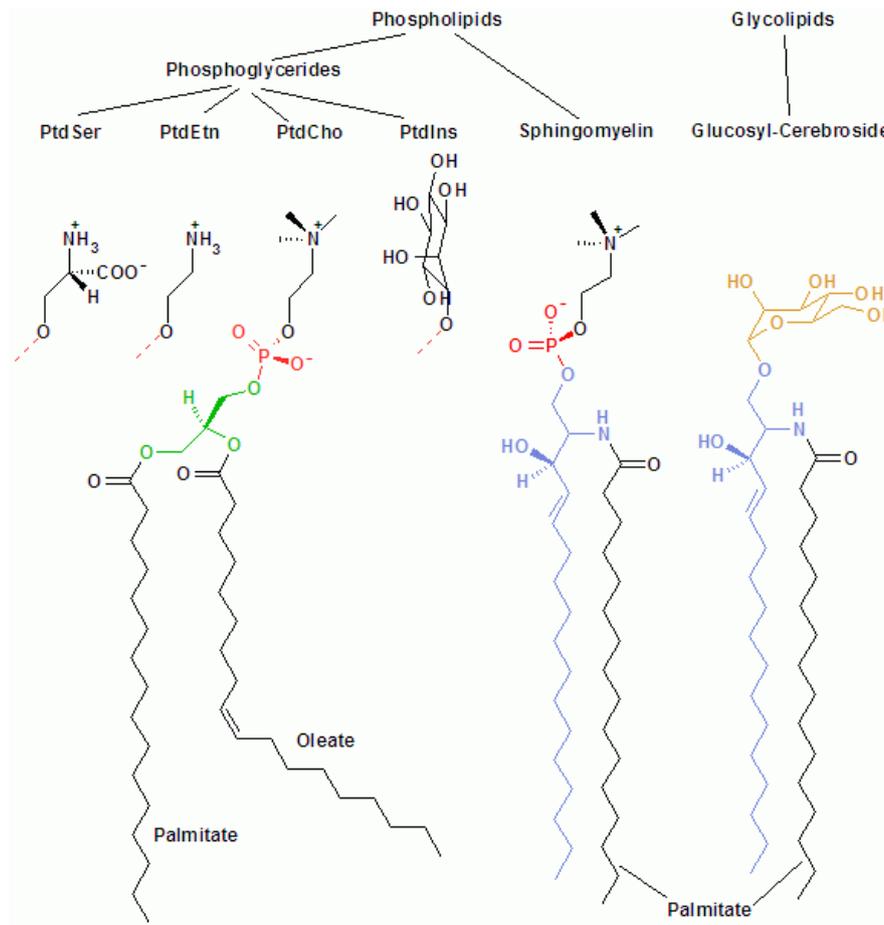
Da un punto di vista costitutivo ed interazionale, nella compagine strutturale delle piastrine, i *fosfolipidi* (esteri caratterizzati da due grassi acilici ed un acido fosforico esterificati con glicerolo o sfingosina) della membrana piastrinica ricoprono un ruolo di primaria importanza in merito all'omeostasi delle stesse, fornendo un'efficiente barriera con l'ambiente extracellulare, una fonte di messaggeri molecolari e metaboliti che sono parte attiva della regolazione delle risposte intracellulari ed extracellulari trombocitarie a seguito di opportuna stimolazione (Feldman et al., 2000).



Fosfolipide.

Nelle piastrine in stato di quiescenza, i fosfolipidi caricati negativamente (od *aminofosfolipidi*), come la *fosfatidilserina (PS)* e la *fosfatidiletanolamina (PE)*, sono presenti in special modo nel versante interno del *bilayer*, diversamente dai fosfolipi neutri, quali *fosfatidilcolina (PC)* e la *singosina (SP)*, diffusi nel versante esterno (Zwaal e Schroit, 1997). Altri fosfolipidi presenti a livello membranario includono il *fosfatidilinositolo (PI)*, *lisolecitina* ed altri lipidi neutri.

La differente composizione in *acidi grassi liberi (FFA)* delle membrane fosfolipidi che delle diverse specie di vertebrati giustificerebbe la differente stabilità di membrana delle stesse (Gentry, 1992).



Lipidi di membrana.

Al momento dell'attivazione piastrinica, si osservano tre modifiche fondamentali interessanti i lipidi di membrana:

1. esaltazione del *turnover* del PI, con conseguente aumentata produzione di *inositolo trifosfato* ( $IP_3$ ), cruciale mediatore del *signaling* intracellulare, e di *1,2-diacilglicerolo* ( $DAG$ );
2. processazione dell'*acido arachidonico*, formatosi principalmente dalla PC ed in misura minore dalla PE, ed ottenimento di diversi metaboliti biologicamente attivi;

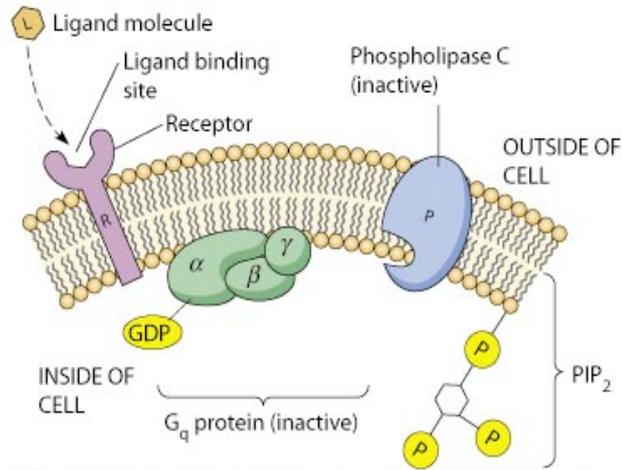
3. la PS trasloca sul versante membranario esterno, entrando a far parte della regolazione del processo che conduce alla produzione di *trombina* (Colman et al., 1994; Zwaal e Schroit, 1997).

Ad ogni modo, i succitati fenomeni sono subordinati all'azione di stimolo, verso le piastrine, da parte di uno o più fattori, quali gli *attivatori solubili* (trombina, ADP, PAF) od i componenti della matrice extracellulare (collagene), mediante l'interazione con queste per mezzo di specifici recettori di membrana.

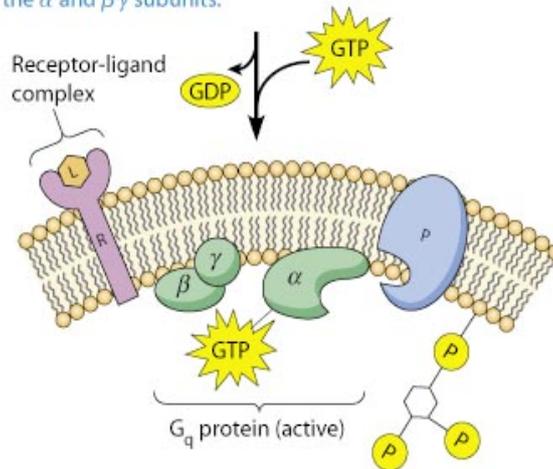
Glicoproteine piastriniche	Sostanze leganti	Funzione
<b>INTEGRINE</b>		
Gp IIb/IIIa	Fibrinogeno, vWF, fibronectina, vitronectina	Aggregazione e diffusione
Recettore vitronectina	Vitronectina, fibrinogeno, fibronectina, trombospondina	Adesione
Gp Ia/IIa	Collagene	Adesione
Gp Ic/IIa	Fibronectina	Adesione
Regione Gp Ic/IIa	Laminino	Adesione
<b>GLICOPROTEINE RICCHE DI LEUCINA</b>		
Gp Ib/IX	vWF	Adesione e cambiamento strutturale
Gp V	Complesso con Gp Ib/IX	Sito legante l' $\alpha$ -trombina, interazione con vWF
<b>SELECTINE</b>		
P-selectine	Lectine	Interazione leucociti-piastrine

Recettori delle glicoproteine sulla membrana piastrinica e loro funzione.

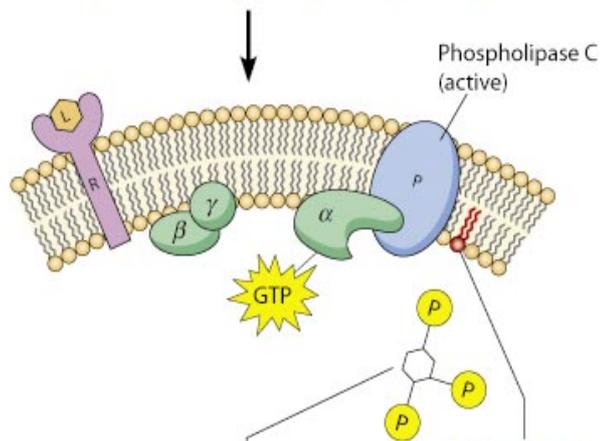
Tutti i recettori di membrana *agonisti* delle piastrine finora identificati appartengono alla vasta famiglia delle proteine transmembranarie leganti l'inositolo trifosfato, anche dette *proteine G* (Gentry, 1992).



1 A receptor is activated by the binding of its ligand. The receptor-ligand complex associates with the G protein  $G_{q\alpha}$ , causing displacement of GDP by GTP and dissociation of the  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits.



2 The GTP- $G_{q\alpha}$  complex then binds to phospholipase C (P), activating it and causing cleavage of  $PIP_2$  into  $IP_3$  and DAG.



3  $IP_3$  is released into the cytosol, where it triggers calcium release.

4 DAG remains in the membrane, where it activates protein kinase C.

Proteina G ed interazioni.

Agonisti DEBOLI	Agonisti FORTI
ADP	Collagene
Epinefrina	Trombina
PAF	Calcio ionizzato
Acido arachidonico	
Vasopressina	
TXA <sub>2</sub>	

Agonisti piastrinici.

I recettori appartenenti alle proteine G sono caratterizzati da un sito di legame sul versante membranario esterno, sette regioni idrofobiche nell'ambito dello spessore della membrana, una componente idrofila sul versante intracellulare (con funzioni di effettore).

Gli aumenti dei tassi intracellulari di calcio, conseguenza dell'*intake* dello stesso a partire dalla matrice extracellulare ed anche della liberazione da parte del *sistema tubulare denso* e dei *granuli densi*, è un evento cardine nell'economia dell'attivazione piastrinica, qualunque sia stato il mediatore che ha dato a questa luogo (Colman et al., 1994).

Alfa-granuli	Delta-granuli
<i>Proteine adesive</i> : vWF, fibronectina, fibrinogeno, trombospodina, vitronectina, P-selectina	ATP, GTP, ADP, GDP, Calcio, Serotonina, Pirofosfato
<i>Regolatori della crescita</i> : fattore di crescita di derivazione piastrinica, fattore piastrinico 4, trombospodina C1-inibitore, chininogeno ad alto peso molecolare	
<i>Fattori della coagulazione</i> : fibrinogeno, fattore V, fattore XI, chininogeno ad alto peso molecolare, inibitore I dell'attivatore del plasmnogeno, proteina S	

Contenuti dei granuli piastrina-specifici.

Il calcio risulta implicato nella regolazione del metabolismo dei lipidi di membrana, tramite gli enzimi *fosfolipasi C (PLC) calcio-dipendenti* e la *fosfolipasi A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)*. Parimenti, il calcio dà luogo all'inizio delle reazioni di *fosforilazione* delle proteine: ad esempio, la *protein chinasi C (PKC)*, che aumenta l'adesione piastrinica ed il legame con il fibrinogeno tramite un cambiamento conformazionale della Gp IIb/IIIa.

L'aumento del calcio intracellulare esita in una diminuzione dell'AMP<sub>c</sub> intracellulare a causa dell'attivazione dell'AMP<sub>c</sub> *fosfodiesterasi*, che promuove indirettamente l'aggregazione piastrinica.

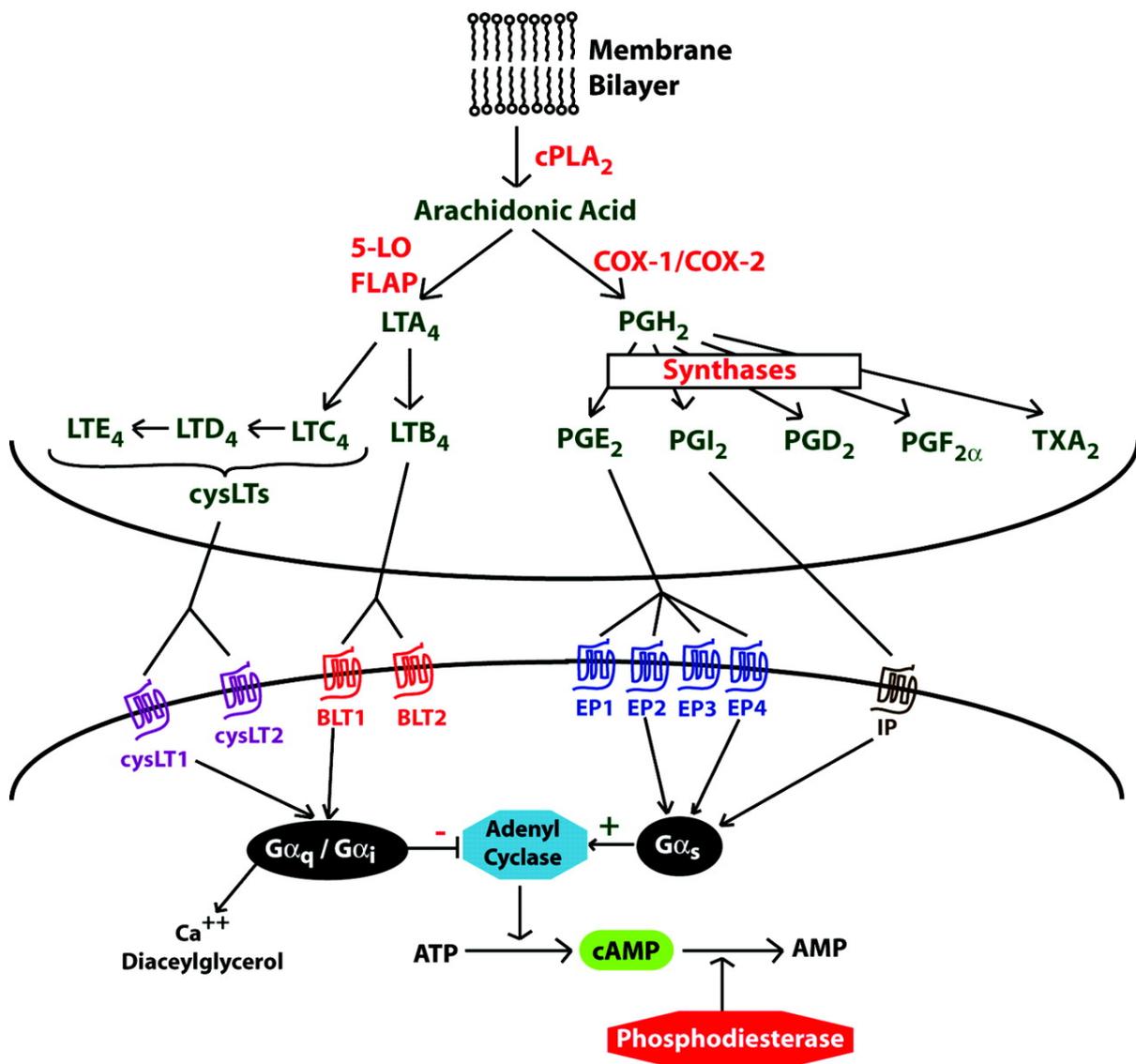
Tutte queste reazioni sortiscono un feed-back positivo sulla reattività piastrinica: in effetti, è stato osservato come, in diversi mammiferi, la somministrazione di calcio-antagonisti (ad esempio, *diltiazem* o *verapamil*), condizionino negativamente l'aggregazione piastrinica (Longenecker, 1985).

L'AA è un costituente fondamentale della membrana piastrinica: il tutto deriva sia da un punto di vista strutturale che funzionale. Il primo trova motivo d'essere nel fatto che l'AA provvede a costituire e stabilizzare il plasmalemma. Il secondo nel fatto che dall'AA si generano diversi ed importanti mediatori della funzione piastrinica, ovvero *prostaglandine (PG)*, *trombossani (TXA)*, *leucotrieni (LTs)* ed *acidi idrossieicosatetraenoici (HETEs)*: tali molecole entrano nel novero degli *eicosanoidi* (Colman et al., 1994; Maclouf et al., 1998).

Prima di poter dar luogo alla formazione degli eicosanoidi, l'AA deve essere rilasciato nell'ambito citosolico: questo è reso possibile dall'azione della PLA<sub>2</sub>, mediata dal calcio. La formazione degli eicosanoidi ha luogo per intervento delle *cicloossigenasi (COX)*, note anche come *prostaglandine H sintetasi (PGHS)*, e di una *12-lipossigenasi*. A livello piastrinico è presente solo la forma COX-1 delle cicloossigenasi, mentre la forma COX-2, forma la cui espressione è indotta da citochine, si ritrova principalmente nelle cellule eucariotiche, incluse le cellule endoteliali (Maclouf et al., 1998): entrambe le forme possiedono attività catalitica.

La processazione dell'AA vede una sua prima trasformazione a *prostaglandina endoperossido (PGG<sub>2</sub>)*, oggetto, a sua volta, di ossidazione e trasformazione a *prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)*. Tali molecole sono piuttosto instabili e vengono rapidamente metabolizzate a TXA<sub>2</sub> dalla *trombossano sintetasi*, a PGI<sub>2</sub> dalla *prostaciclina sintetasi* o a PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> o PGF<sub>2</sub> da *isomerasi* non ancora meglio identificate.

Il TXA<sub>2</sub>, maggior metabolita piastrinico, si presenta molto labile, motivo per il quale, un suo metabolita TXB<sub>2</sub> viene impiegato per valutare il metabolismo dell'AA e l'attività della TX sintetasi: le piastrine stimulate dal collagene o dalla trombina producono una maggiore quantità di TXB<sub>2</sub> delle stesse stimulate dall'ADP o dal PAF.



Formazione degli eicosanoidi.

Sebbene la principale attività biologica del PAF è riconosciuta nell'attivazione piastrinica, degno di nota è anche il suo ruolo nell'ambito della risposta

infiammatoria e che questi è prodotto da diverse linee cellulari: l'azione sulle piastrine del PAF, ovvero lo stimolo all'aggregazione, può essere o meno dipendente dal TXA<sub>2</sub>.

Nell'ambito dell'attivazione piastrinica, sulla superficie dei trombociti si ha l'esposizione di due siti di legame per altrettanti molecole plasmatiche: il *fattore VIIIa* ed il *fattore Va*, che sono coinvolti, rispettivamente, nella formazione del *complesso della tenasi* ed il *complesso della protrombinasi*. Tali complessi interagiscono rapidamente fino alla formazione della *serina proteasi*, del *fattore Xa* e della trombina, sulla superficie delle piastrine attivate. L'importanza di queste reazioni risiede nel mantenimento di una corretta emostasi, così come dimostrato, per differenza, nei soggetti affetti da *sindrome di Scott* (Zwaal e Schroit, 1997).

Diversi sono i meccanismi che hanno carattere inibitorio nei confronti della coagulazione e che sono mediati dai lipidi, così come massimamente provato dall'attività della PGI<sub>2</sub>, la cui produzione è stimolata da sostanze quali *istamina*, *bradichinina*, AA, ADP (rilasciati dalle piastrine attivate) a livello di cellule endoteliali (Gentry, 1992; van Hinsbergh, 1996).

Le piastrine costituiscono il primo istituto dell'organismo animale quale rimedio al sanguinamento, dovuto ad una effratta integrità vasale: allo stesso tempo, assolvono a ruoli fondamentali nello sviluppo dell'infiammazione e di riparazione delle ferite, attraverso il rilascio, una volta attivate, di sostanze in grado di influenzare l'attività di altre cellule del sangue e dell'endotelio (Gentry, 1992).

In condizioni ordinarie, le piastrine non interagiscono con le altre cellule del sangue, con l'endotelio o tra loro: altresì presentano rapida reazione a condizioni opportune per il loro reclutamento ed attivazione (Ruggeri, 1994).

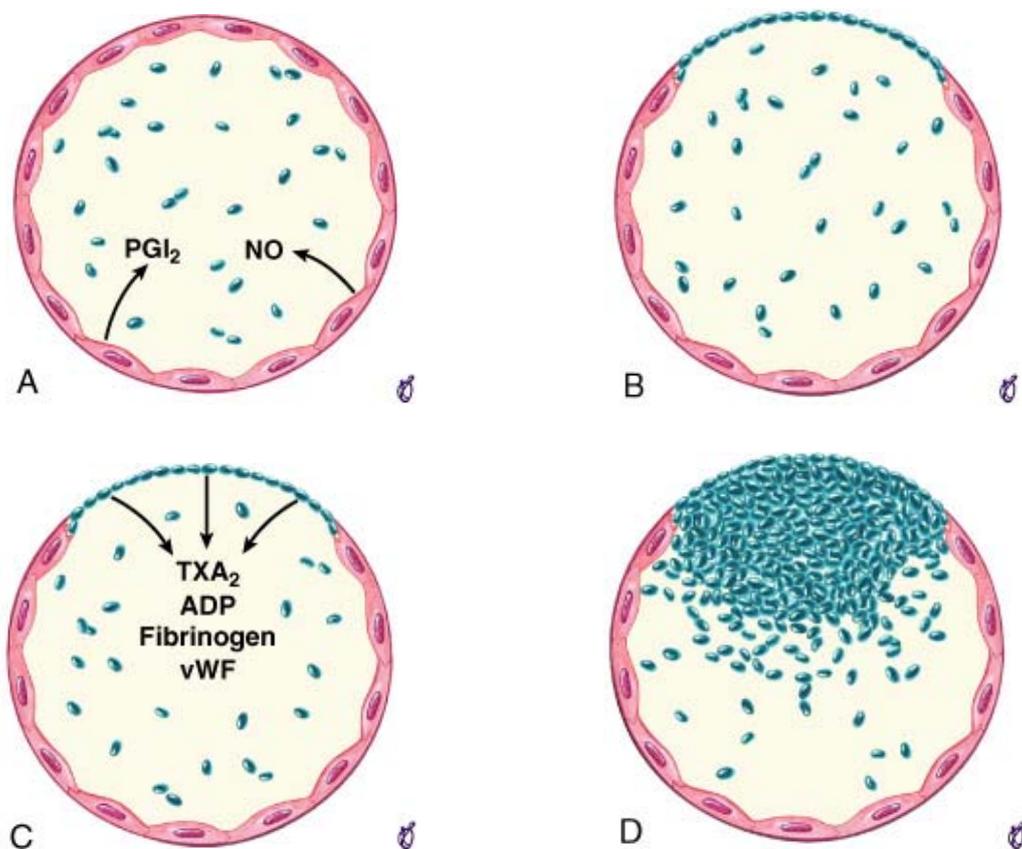
Il danno dell'intima vasale riduce localmente le proprietà antiaggreganti dell'endotelio, mentre le sostanze sub-endoteliali trombogeniche, normalmente segregate, vengono esposte al torrente circolatorio. Le piastrine circolanti riconoscono le sedi di danno vascolare ed aderiscono al sito della lesione.

L'adesione determina la formazione di un monostrato trombocitario fissato alla superficie intimale lesa: si assiste a cambiamenti conformazionali dei trombociti, risolvendosi nell'attivazione dei recettori (*CD41/CD61*) della Gp IIb/IIIa, dotati della capacità di provvedere al supporto dell'adesione delle piastrine sia al fibrinogeno che al *fattore di von Willenbrand*.

In condizioni di flussi a bassa velocità, l'interazione tra il fibrinogeno e la Gp IIb/IIIa è a tal punto facilitato, da comportare una spontanea aggregazione trombocitaria: ad ogni modo, è anche vero che in condizioni di esasperata velocità di flusso (e turbolenza) l'adesione è maggiormente evocabile ed inducibile tramite l'interazione tra *fattore di von Willenbrand* e Gp IIb/IIIa e recettori piastrinici IX/V (*CD42b+CD42c/CD42a/CD42d*) (Colman et al., 1994). Tale ultima interazione descritta non consente, tra l'altro, che i flussi ad alta velocità e turbolenti provochino il distacco del prodotto dell'adesione piastrinica.

La risposta piastrinica ed efficienza della stessa ad opportuna stimolazione agonista è in diretta dipendenza del numero e tipo di recettori presenti e dalla capacità delle piastrine di sintetizzare e rispondere al  $\text{TXA}_2$  (Colman et al., 1994).

L'adesione piastrinica (ovvero, l'interazione piastrina-intima vasale) è mediata principalmente dal *fattore di von Willenbrand* (*vWF*) (Ruggeri, 2001).

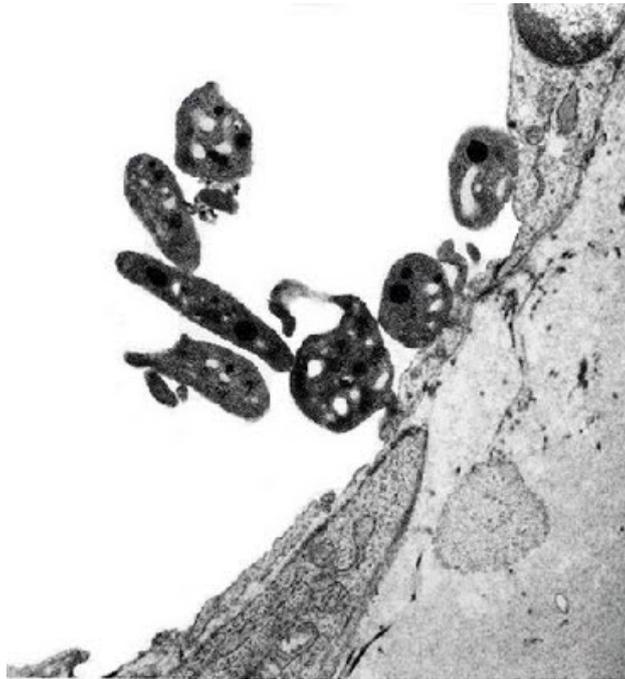


A.: condizioni ordinarie, rilascio di mediatori di inibizione piastrinica; B.: danno endoteliale ed esposizione della matrice sub-endoteliale; C.: piastrine attivate da fattori tissutali ed auto attivate; D.: tappo piastrinico occlusivo.

Il vWF è una proteina polimerica costituita da un ampio spettro di sub-unità polimerizzate che creano una proteina matura con una massa molecolare che varia da circa 550 a più di 10'000 kDa, una delle più grosse proteine solubili presenti nel

plasma (Ruggeri, 2001): è sintetizzato sia dalle cellule endoteliali che dai megacariociti, dove è depositato, rispettivamente, nei *corpi di Weibel-Palade* e nei *granuli alfa*, prima della sua secrezione regolata (de Wit e van Mourik, 2001).

Il vWF rilasciato è presente sia nel plasma che nella matrice extracellulare della regione sub-endoteliale della parete vasale, cui si ancorano le piastrine. I grandi polimeri di vWF forniscono la principale “colla molecolare” per far aderire le piastrine alla parete vasale danneggiata, con una forza sufficiente a tollerare le elevate sollecitazioni di taglio che tenderebbero a distaccarle con il flusso ematico (de Wit e van Mourik, 2001).



Piastrine attivate sul sito di una lesione endoteliale.

Il recettore per il vWF sulla superficie piastrinica è localizzato nella *glicoproteina di membrana Ib (Gp Ib)*, che fa parte del complesso *Gp Ib/IX-V* della membrana piastrinica (Andrews et al., 1999).

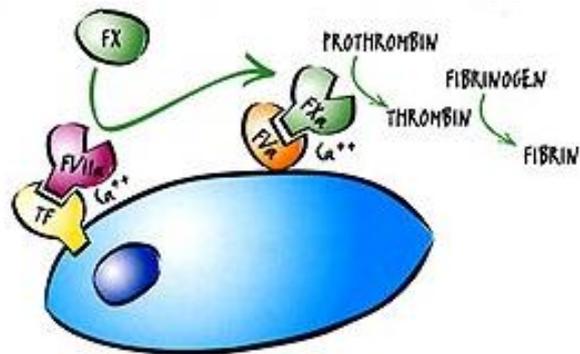
I livelli più elevati di sollecitazione di taglio sul versante arterioso della circolazione promuovono l'interazione tra vWF e Gp Ib della membrana piastrinica, probabilmente attraverso sottili modificazioni indotte dalle sollecitazioni sulla molecola del vWF e/o sul suo recettore piastrinico (Andrews et al., 1999; McEver, 2001). È stata descritta, inoltre, un'adesione piastrinica dipendente da Gp Ib-vWF all'endotelio intatto "attivato" in condizioni di basso flusso (Andre et al., 2000).

L'adesione piastrinica è facilitata anche dal legame diretto al collagene sub-endoteliale per mezzo di recettori specifici per il collagene sulla membrana piastrinica, tra cui  $\alpha_2\beta_1$  *integrina* (conosciuta anche come *Gp Ia/IIa*) ed il membro della superfamiglia delle immunoglobuline *Gp VI* (Savage et al., 1998; Nakamura et al., 1999).

In condizioni di elevate sollecitazioni di taglio in piccole arterie, Gp Ib e Gp VI possono agire in accordo per fissare rapidamente le piastrine alla matrice extracellulare esposta della parete vasale lesa tramite i loro rispettivi ligandi, vWF e collagene (Nieswandt e Watson, 2003). Successivamente, la generazione di segnali intracellulari da Gp Ib e Gp VI porta all'attivazione piastrinica ed all'attivazione dei recettori dell'integrina per rinforzare l'adesione iniziale.

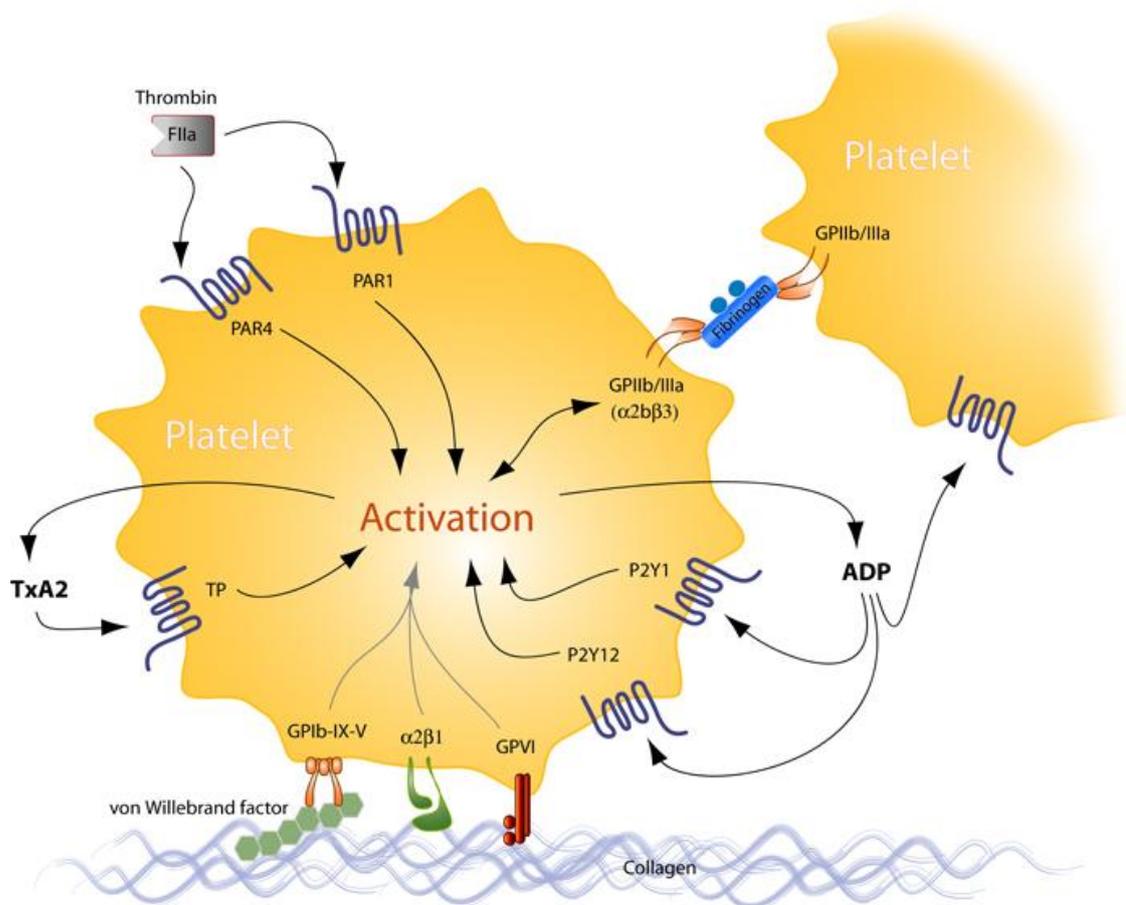
Successivamente all'adesione piastrinica, le cellule endoteliali esprimono il *fattore proteico tissutale transmembranario (fattore tissutale, TF)*: tale fattore si lega

al *fattore VII (fVII)* circolante, onde formare un complesso proteolitico attivo, il *TF-fVII*, appunto, che innesca una serie di reazioni culminanti con la formazione della *trombina* (Semeraro e Colucci, 1997).



Fattore tissutale ed interazioni.

A seguire la fase di adesione piastrinica è, come precedentemente menzionato, l'*attivazione piastrinica*: quivi, le piastrine fissatesi all'intima vasale, vanno incontro ad attivazione, appunto. Tale processo risulta dall'azione combinata di diversi agonisti che si legano ai loro rispettivi recettori di membrana sulle piastrine adese e che trasmettono dei segnali intracellulari per l'attivazione piastrinica (Ruggeri, 2002; Loscalzo e Schafer, 2003).

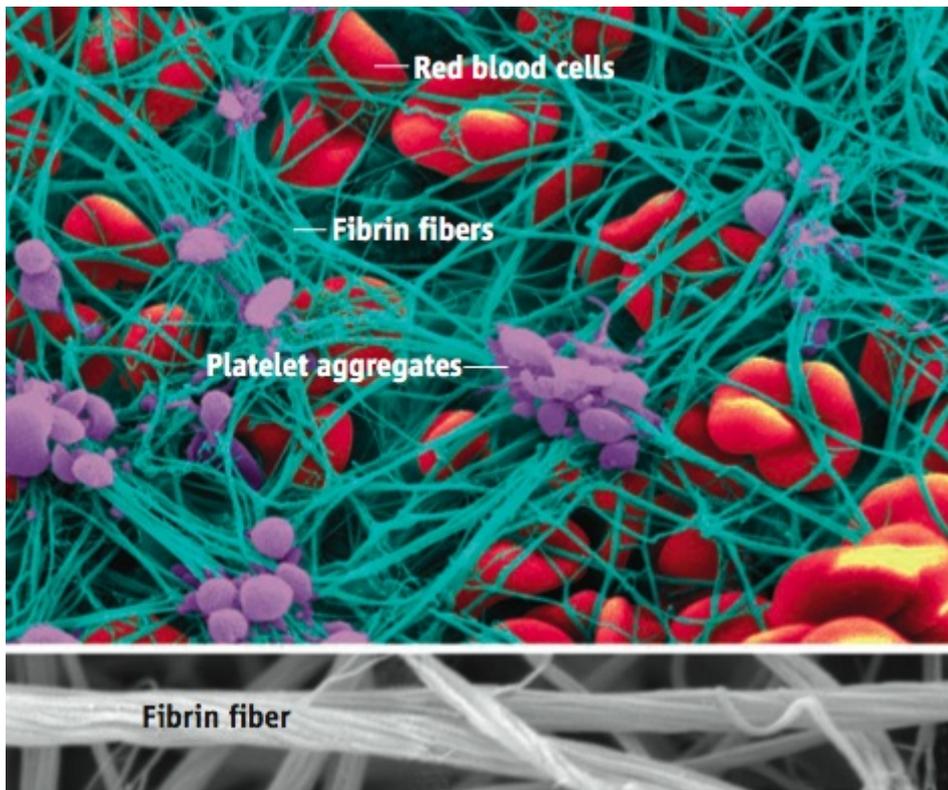


Attivazione piastrinica.

Tali stimoli per le piastrine includono mediatori umorali nel plasma (ad esempio, *adrenalina*, trombina), mediatori rilasciati dalle cellule attivate (ad esempio, *ADP*, *serotonina*) e costituenti della matrice extracellulare della parete vasale che vengono a contatto con le piastrine adese (ad esempio, *collagene*, vWF). Molti di questi stimoli possono attivare sinergicamente le piastrine e possono anche agire di concerto con le forze di taglio cui le piastrine sono contemporaneamente esposte.

La *trombina* è un agonista attivatore efficiente ed “universale” dell’intera sequela di eventi concludentisi con la completa realizzazione dell’emostasi: tramite attività proteolitica, dà luogo ad opportuno *cleavage* del *fibrinogeno*, onde portare alla formazione di *fibrina*. Da sottolineare come, inoltre, sebbene di gran lunga

inferiore alla quota di fibrinogeno circolante, quella contenuta nei granuli alfa delle piastrine ha comunque un ruolo non secondario nel fornire adeguato substrato all'attività della trombina (Allegrezza-Giulietti et al., 1991).



Coagulo, dettaglio.

L'attività combinata tra la trombina nell'esposizione dei siti di legame sulle piastrine attivate e la formazione della fibrina ha come risultato una notevole amplificazione del processo che porta alla formazione della rete di fibrina sul sito ove si è realizzato il danno endoteliale: tutto ciò determina stabilizzazione *in situ* degli aggregati ed accelera la formazione di trombina, in ragione dell'attività procoagulante che viene a realizzarsi in tale microambiente (Ruggeri, 1994; Colman et al., 1994).

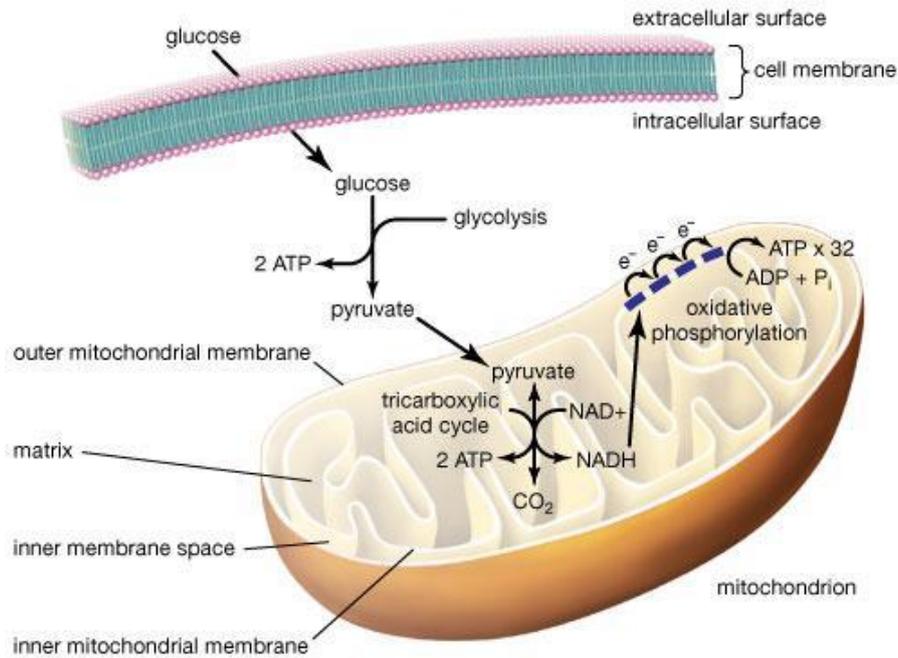
Al pari di altre cellule, anche le piastrine dipendono dall'ATP per l'approvvigionamento energetico, onde mantenere l'integrità morfofunzionale e poter provvedere a reagire in maniera competente in caso di necessità.

Nelle piastrine in stato di quiescenza, gran parte dell'ATP è impiegato per mantenere l'*equilibrio osmotico*, per regolare i livelli di AMP<sub>c</sub> e la conformazione dei fosfolipidi di membrana (Colman et al., 1994).

I depositi intracellulari di glicogeno, derivanti per lo più dai MK che da una produzione *ex novo*, rappresentano la maggiore fonte di energia, sebbene le piastrine circolanti siano anche capaci di servirsi del *glucosio* presente a livello circolatorio per mezzo di *carriers* membranari. Glucosio e glicogeno vengono dunque metabolizzati ad ATP ed *acido piruvico* mediante *glicolisi*.

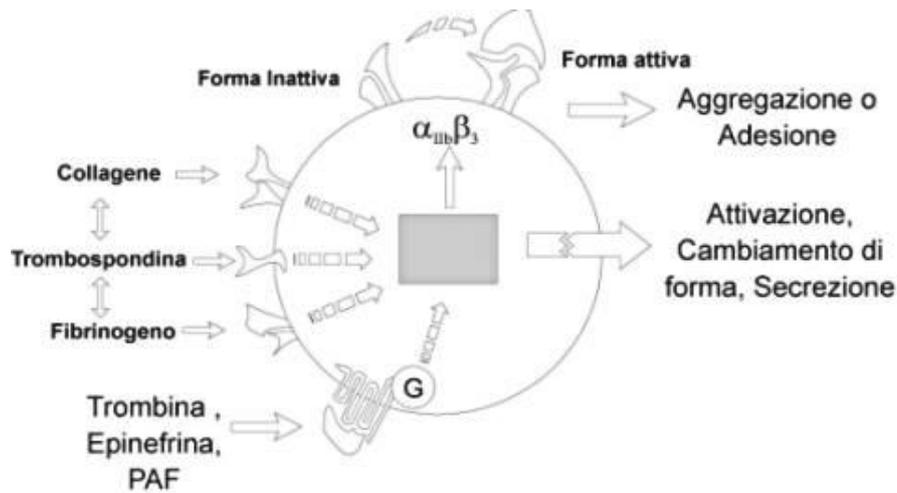
Visto che le piastrine contengono un numero esiguo di mitocondri, l'acido piruvico è ridotto ad *acido lattico*, che diffonde fuori dalle cellule.

Nelle piastrine attivate, la *fosforolisi del glicogeno* è stimolata dall'aumento del calcio citosolico.



Produzione di ATP.

Le piastrine attivate vanno incontro ad una reazione di rilascio, durante la quale secernono costituenti già pronti presenti nei loro granuli citoplasmatici; proteine di adesione solubili (*fibrinogeno*, *vWF*, *trombospondina*, *fibronectina*), fattori di crescita (tra cui il *fattore di crescita trasformante alfa* e quello *beta*) e pro coagulanti (*fattore piastrinico 4*, *fattore V*) dai granuli alfa.



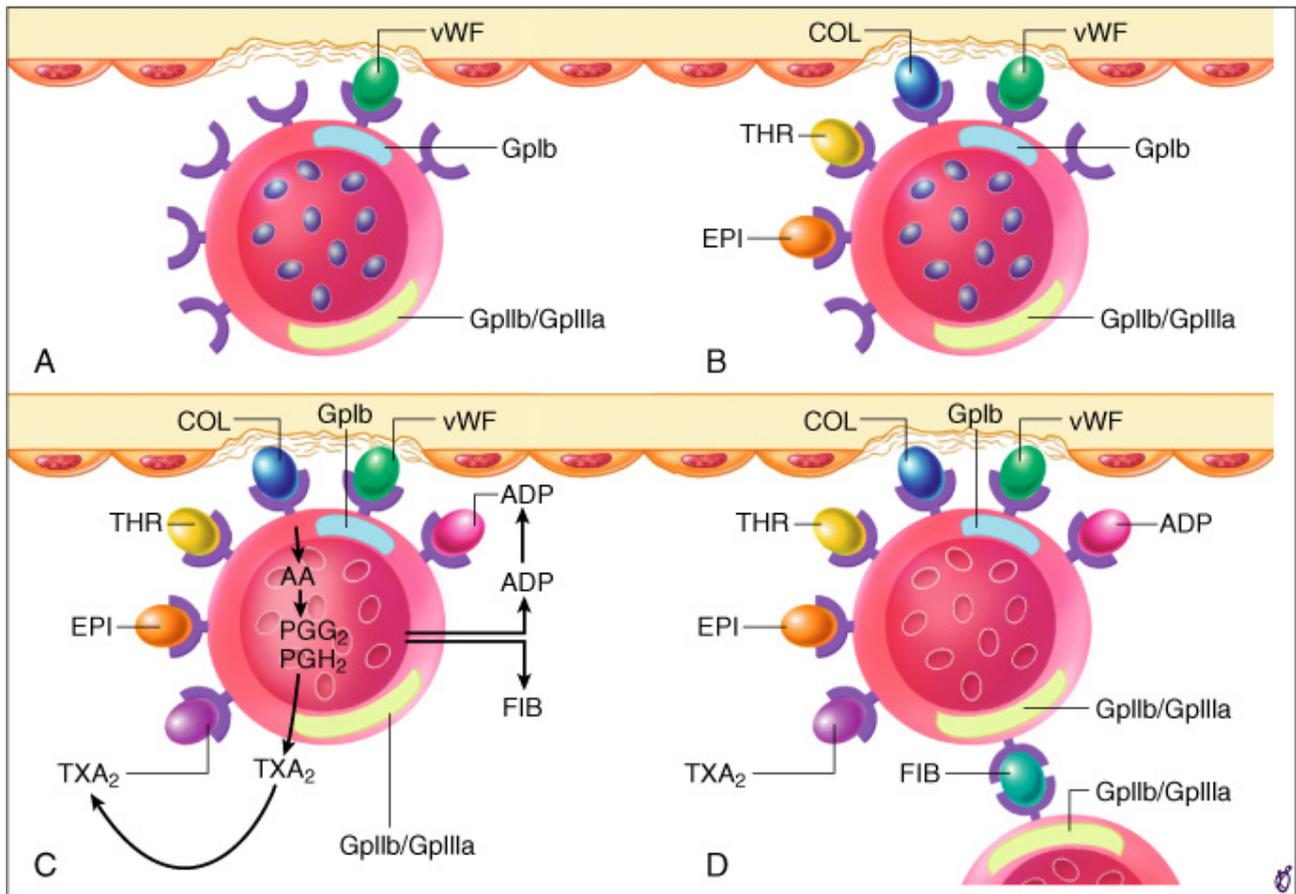
Attivazione piastrinica.

Allo stesso tempo, le piastrine attivate sintetizzano e rilasciano il  $\text{TXA}_2$ , potente vasocostrittore ed attivatore piastrinico. Il  $\text{TXA}_2$  è il principale prodotto della ciclo-ossigenasi nel metabolismo dell'acido arachidonico delle piastrine (Ruggeri, 2002; Loscalzo e Schafer, 2003).

I prodotti della reazione di rilascio delle piastrine, incluse le sostanze contenute nei granuli ed il  $\text{TXA}_2$ , mediano la fase finale dell'attivazione, il processo di aggregazione (Ruggeri, 2002). Durante l'aggregazione piastrinica (interazione piastrina-piastrina) vengono reclutate ulteriori piastrine dalla circolazione nel sito del danno vascolare, portando alla formazione del *trombo piastrinico occlusivo*: questo è ancorato e stabilizzato dai filamenti di fibrina che si sviluppano simultaneamente come prodotto della cascata coagulativa .

A bassi livelli di flusso (ad esempio, nella circolazione venosa), la “colla molecolare” che media l'aggregazione piastrinica è il fibrinogeno, che può derivare dal plasma od essere rilasciato dai granuli alfa delle piastrine attivate.

A livelli di flussi più elevati (ad esempio, nelle arterie), lo stesso vWF, che è anche il ligando che media l'adesione piastrinica, può sostituire il fibrinogeno come ligando per l'aggregazione.



A.: l'adesione delle piastrine alla superficie intima vascolare danneggiata è mediata dal legame del vWF al suo recettore Gp Ib sulla membrana piastrinica; B.: le piastrine adese sono anche ancorate al vaso danneggiato per mezzo del legame del collagene endoteliale (COL) sui rispettivi recettori piastrinici per il COL. Altri fattori di stimolo per le piastrine nel sangue, incluse la trombina (THR) e l'epinefrina (EPI), si legano ai loro rispettivi recettori; C.: in risposta a questi diversi stimoli, le piastrine adese sono attivate e rilasciano il TXA<sub>2</sub> e l'ADP, che si legano ai loro rispettivi recettori piastrinici ed amplificano l'attivazione; D.: l'aggregazione piastrinica è mediata dal fibrinogeno (FIB) attraverso il legame sui propri recettori presenti sulle piastrine adese, formando ponti di fibrinogeno. Il recettore FIB è formato dal complesso della Gp IIb/IIIa sulla membrana delle piastrine attivate.

AA: acido arachidonico; PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>: endoperossidasi prostaglandine labili.

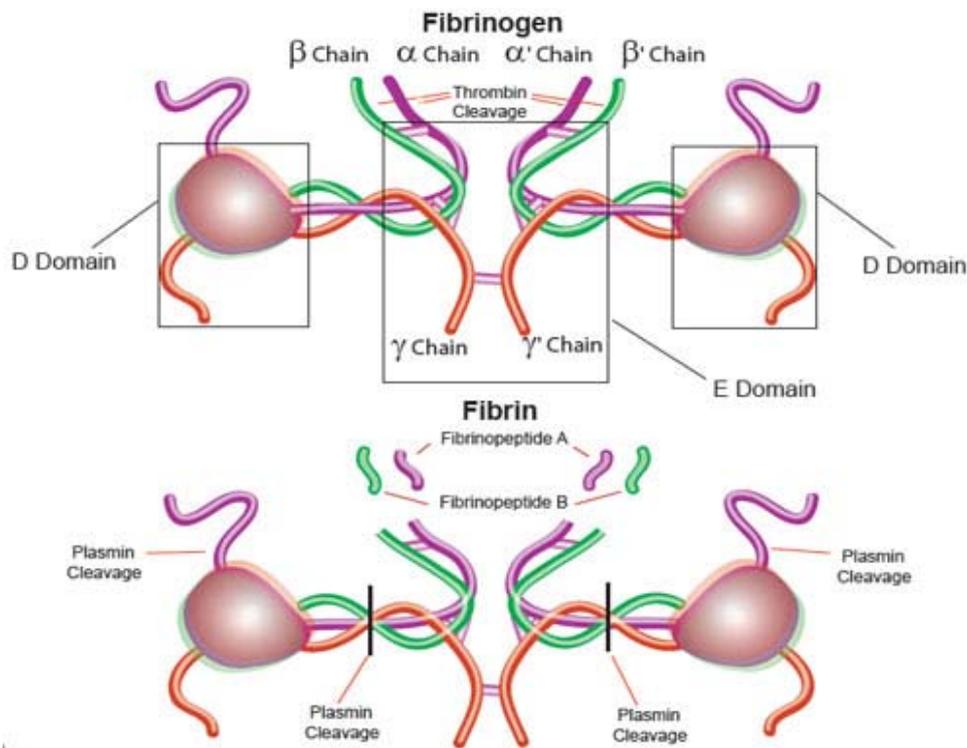
Il fibrinogeno ed il vWF si legano a recettori specifici sulla membrana piastrinica, che sono localizzati nel complesso integrinico Gp IIb/IIIa.

Le integrine sono ampiamente distribuite sulla superficie delle cellule eucariotiche che hanno capacità di adesione.

Tutti i recettori della superfamiglia delle integrine contengono una sub-unità *alfa* ed una sub-unità *beta*. Le singole integrine spesso si possono legare a più di un ligando; in questo modo, il Gp IIb/IIIa piastrinico può riconoscere sia il fibrinogeno che il vWF, nonché altre proteine di adesione (Thomas et al., 1998; Loscalzo e Schafer, 2003).

Il complesso Gp IIb/IIIa è il recettore più espresso sulla superficie piastrinica: la sua sub-unità alfa (Gp IIb) è espressa in modo specifico sulle piastrine, ma la sua sub-unità beta<sub>3</sub> (Gp IIIa) è condivisa da altre integrine, compresi i recettori espressi sulle cellule endoteliali. I complessi eterodimerici IIb/IIIa normalmente non sono esposti in forma attiva sulla superficie delle piastrine attivate circolanti non attivate.

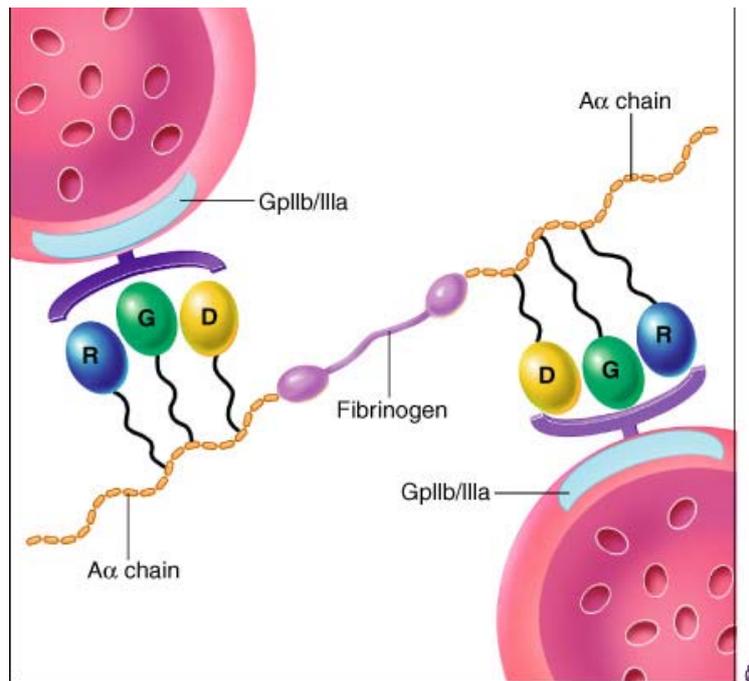
Tuttavia, l'attivazione piastrinica converte la Gp IIb/IIIa in recettori funzionali per mezzo di specifiche vie di trasduzione del segnale (Jackson et al., 2003), abilitando il Gp IIb/IIIa a legare il fibrinogeno ed il vWF.



Fibrinogeno e fibrina.

Il legame di queste proteine richiede che esse contengano la specifica sequenza tripeptidica *Arginina-Glicina-Acido aspartico* (RGD) (Bennet, 2001). Il riconoscimento del fibrinogeno e di altri ligandi da parte del complesso Gp IIb/IIIa attivo coinvolge la sequenza RGD (localizzata alle posizioni 95-97 e 572-574 in ciascuna delle due catene *alfa* del fibrinogeno).

Quando due piastrine attivate esprimono recettori Gp IIb/IIIa funzionali legano la stessa molecola di fibrinogeno, si genera un ponte di fibrinogeno tra le stesse.



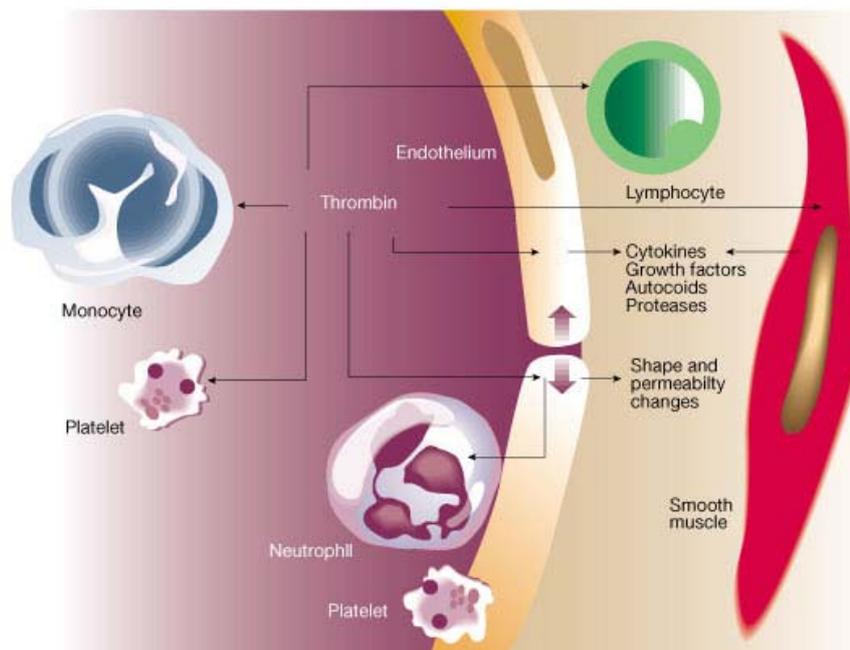
Recettori di membrana e fibrinogeno.

Dato che la superficie di ogni piastrina presenta circa 50'000 siti di legame Gp IIb/IIIa per il fibrinogeno, le numerose piastrine attivate, reclutate nel sito del danno vascolare, possono formare rapidamente un aggregato occlusivo per mezzo di una densa rete di ponti intercellulari di fibrinogeno (Bennett, 2001).

Oltre alle sue sequenze RGD, le catene *gamma* del fibrinogeno contengono anche un residuo di 12 aminoacidi (dodecapeptide *HHLGGAKQAGDV*), anch'esso in grado di legare il recettore Gp IIb/IIIa (Schafer, 1997).

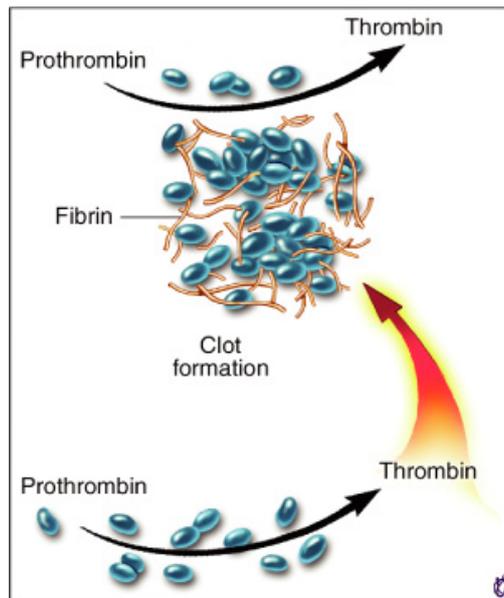
La trombina svolge un ruolo fondamentale nel coordinare, integrare e regolare l'emostasi. A seconda delle circostanze, essa può promuovere o prevenire la coagulazione del sangue. Questo effetto multivalente della trombina è stato descritto come il *paradosso della trombina* (Griffin, 1995).

Quando la trombina libera è disponibile nel sangue ad alte concentrazioni, soprattutto nel sito del danno vascolare dove viene perduta l'influenza antitrombotica dell'endotelio, la trombina è un potente induttore della coagulazione.



Interazioni piastrine-leucociti-endotelio.

Questo enzima catalizza le reazioni d'attivazione di diversi fattori della coagulazione che portano alla formazione di fibrina, all'attivazione del fattore XIII per promuovere i legami crociati della fibrina, all'attivazione ed all'aggregazione delle piastrine. Infatti, in queste condizioni pro coagulanti, si osservano interazioni reciproche, interdipendenti e che tendono ad auto amplificarsi tra generazione di trombina ed attivazione piastrinica. Le membrane delle piastrine attivate facilitano la generazione di trombina fornendo una superficie per l'assemblaggio dei fattori e cofattori della coagulazione.

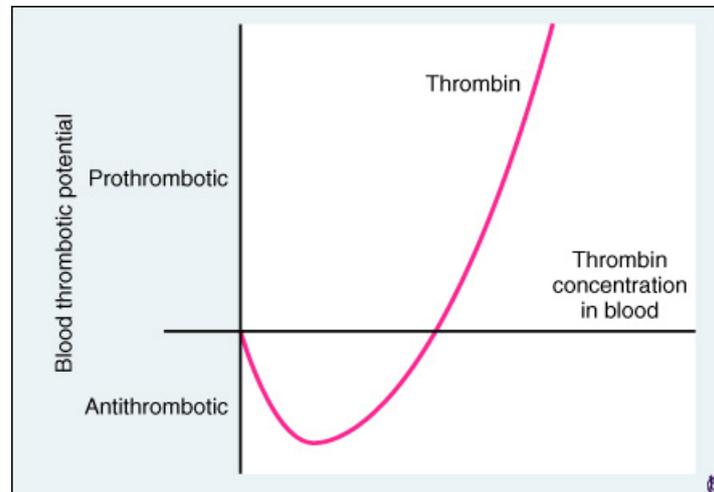


*Il paradosso della trombina.*

Viceversa, la trombina è un potente attivatore delle piastrine e stimola la disponibilità di ulteriore superficie piastrinica attivata per la generazione di ulteriore trombina. In tale modo, questa reciproca interazione tra trombina e piastrine favorisce ed amplifica la formazione di un tappo emostatico di piastrine e fibrina localizzato. A concentrazioni di trombina più basse ed in presenza di endotelio intatto, “non attivato” e “non infiammato”, predominano gli effetti antitrombotici.

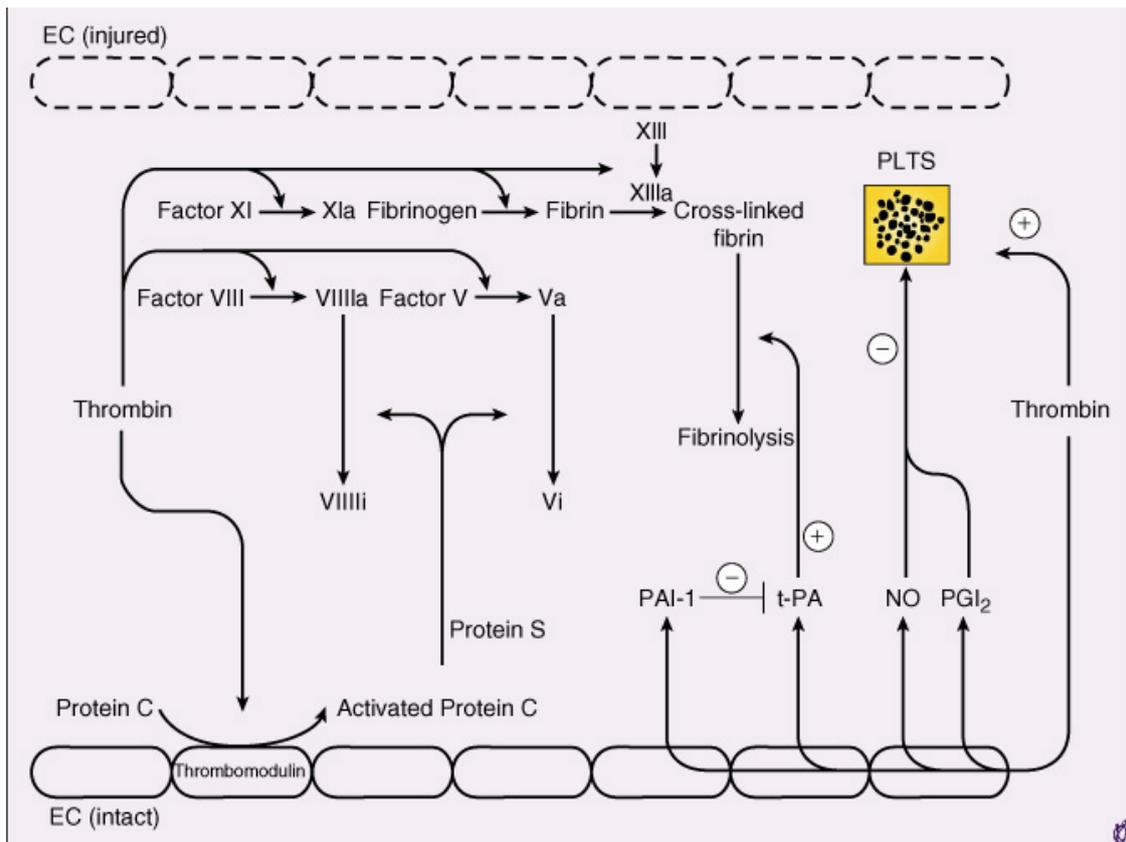
Bassi livelli di trombina stimolano l’aumento dei livelli di un efficiente anticoagulante endogeno: la *proteina C* attivata (Hanson et al., 1993; Mann et al., 2003).

Pertanto, una curva a “J” descrive la relazione esistente tra il potenziale trombotico del sangue e la concentrazione della trombina libera (Griffin, 1995).



Potenziale trombotico del sangue e trombina.

Inoltre, la presenza di cellule endoteliali normali nella circolazione intatta, la trombomodulina endoteliale rimuove la trombina libera dal sangue e le basse concentrazioni di trombina stimolano il rilascio di *attivatore del plasminogeno di tipo tissutale (t-PA)* e delle sostanze antiplastriniche  $\text{PGI}_2$  e NO dalle cellule endoteliali.



Coagulazione ed endotelio.

L'inflammatione porta ad una ridotta espressione endoteliale della trombomodulina, riducendo i suoi effetti antitrombotici (Esmon, 2003).

I due meccanismi di base che modulano la formazione e le dimensione dei trombi si riconoscono in:

1. rilascio, nella sede del danno endoteliale, di fattori inibenti ad opera delle cellule endoteliali;
2. soppressione della produzione di trombina sulla superficie delle piastrine attivate.

Si può affermare, che possono riconoscersi tre sostanze fondamentali, quali fattori rilasciati dall'endotelio con funzione di regolazione della formazione del trombo, ovvero: PGI<sub>2</sub>, che agisce quale inibitore della funzione piastrinica mediante innalzamento dei livelli di AMP<sub>c</sub> citosolico; il *fattore rilassante endotelio-dipendente/ossido nitrico (EDRF/NO)*, che agisce in maniera analoga alla PGI<sub>2</sub>, ovvero innalzando i livelli di GMP<sub>c</sub> intracellulari; l'*ectoadenosina difosfatasi (ecto-ADPase)*, che provvede alla metabolizzazione dell'ADP rilasciato dalle piastrine ad AMP ed adenosina (Marcus e Safier, 1993).

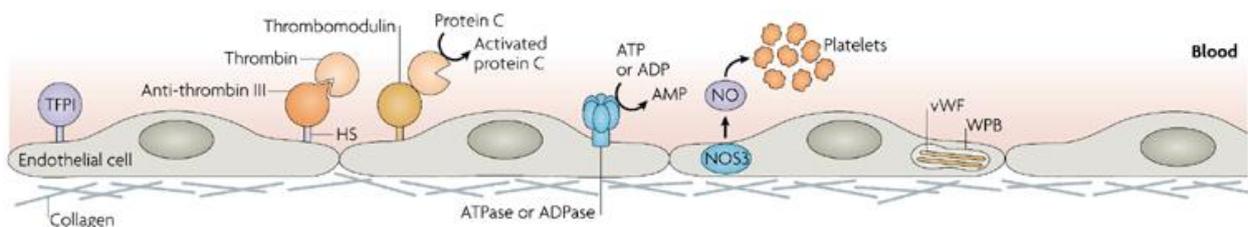
Il primo meccanismo che conduce ad una limitazione della velocità di formazione del trombo è la proteolisi del *fattore VIIIa (fVIIIa)* e *Va (fVa)* nelle rispettive forme inattive *fVIIIi* e *fVi* ad opera della *proteina C attivata (APC)*. Poiché fVIIIa e fVa sono cofattori che regolano la velocità di formazione dei complessi proteolitici *tenasi* e *protrombinasi*, la loro inattivazione esita in una soppressione della formazione di trombina. La formazione dell'APC è iniziata ad opera della stimolazione della trombina nei confronti delle cellule endoteliali per l'espressione, sulla superficie di quest'ultime, della *trombomodulina*.

Successivamente, la trombina lega la trombomodulina, dando vita ad un complesso altamente reattivo, col compito di convertire la proteina C nella sua forma attiva. La genesi di APC è uno dei poche meccanismi di feed-back negativo della trombina. L'azione inibitoria dell'APC è amplificata, nonostante la sua interazione con la *proteina S* (proteina vitamina K-dipendente, sintetizzata dal fegato e dalle

cellule endoteliali. È cofattore della PC, nonché amplificatore della sua attività), presente a livello plasmatico, e con la PS.

L'effetto della formazione dell'APC sulla superficie delle piastrine, in prossimità dei complessi procoagulanti, blocca sia la genesi del *fattore Xa* (*fXa*) che della trombina (Gentry, 1992).

Un secondo meccanismo inibitore della formazione del trombo è mediato dalle piastrine e coinvolge l'*inibitore della via del fattore tissutale* (*tissue factor pathway inhibitor, TFPI*), un potente inibitore dell'attivazione della protrombina attraverso la via TF-fVIIa-fXa (Broze, 1992).



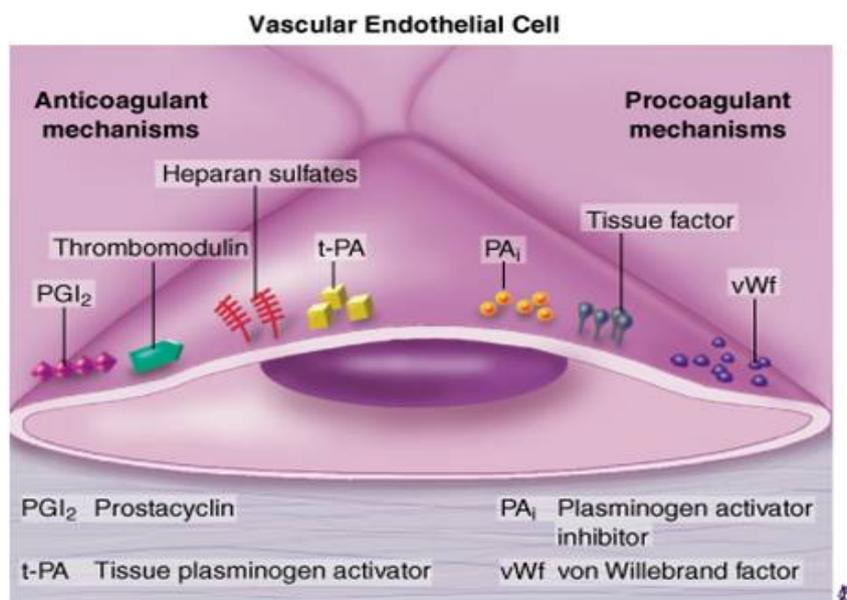
Endotelio e coagulazione.

La frazione di TFPI che circola associato alle membrane piastriniche viene rilasciata dalle stesse dopo loro attivazione: il TFPI associato alle membrane piastriniche può sopprimere la coagulazione iniziata ad opera degli aggregati piastrinici adesi al sito di lesione.

Le piastrine contengono numerosi fattori ad attività mitogena, compreso il *fattore di crescita piastrino-derivato* (*platelet-derived growth factor, PDGF*), l'*epidermal growth factor* (*EGF*) ed il *fattore di crescita trasformante beta* (*TGFβ*).

I MK sono una fonte di PDGF, che viene conservato nei granuli alfa a concentrazioni migliaia di volte superiori a quelle dei livelli circolanti (Colman et al., 1994).

Una volta rilasciato dalle piastrine in fase di aggregazione, il PDGF promuove la riparazione delle soluzioni di continuo, stimolando in senso mitogeno le cellule muscolari lisce ed i fibroblasti: il rilascio di PDGF è associato ad eccessiva crescita cellulare, evento che può osservarsi in casi di aterosclerosi e neoplasie (Gentry et al., 1992; Boudreaux, 1996).



Endotelio e coagulazione.

Diversamente da PDGF e EGF, che stimolano la proliferazione fibroblastica, il TGF $\beta$  inibisce quella di diversi tipi cellulari, incluse le cellule endoteliali.

Ad ogni modo, poiché può aumentare selettivamente la produzione di integrine e di inibitori delle proteasi e diminuire quella delle proteasi che degradano le proteine

della matrice extracellulare, il TGF $\beta$  rilasciato nel sito di un danno endoteliale può assumere la funzione modulatrice della proteolisi vascolare e, di riflesso, favorire la riparazione tissutale.

## TROMBOCITOPENIE IMMUNOMEDIATE

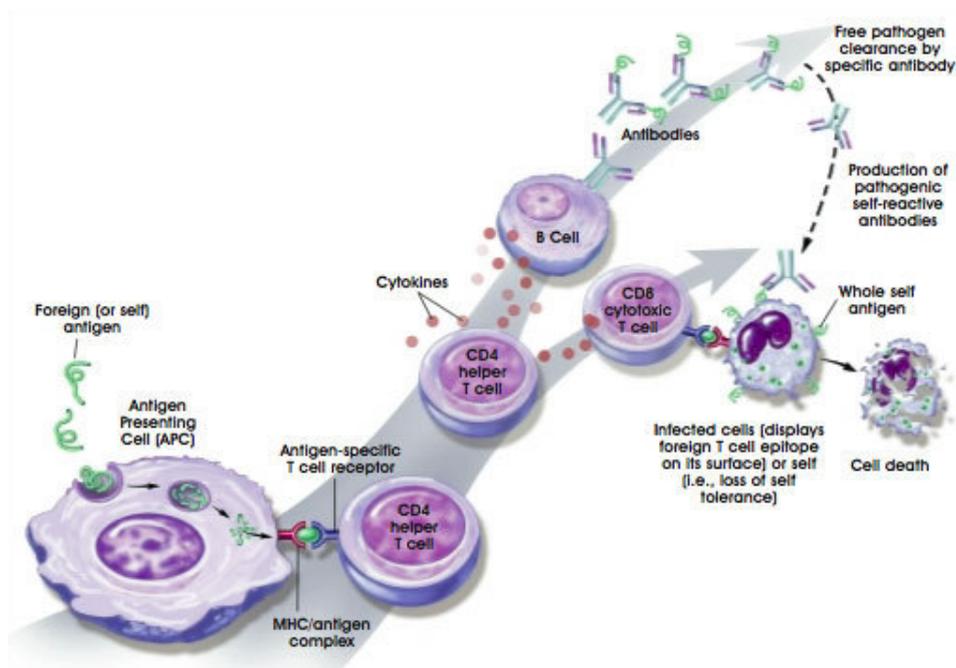
I riflessi ematologici di patologie di natura immunologica si riconoscono nella correlata risposta leucocitaria, nella trombocitosi reattiva, nella trombocitopenia, nell'anemia da stato persistente di infiammazione e nella disprotidemia (Feldman et al., 2000; Connors e Britton, 2009).

I fenomeni immunitari che sono alla base delle succitate alterazioni possono derivare e/o riconoscersi in anomalie di natura congenita, allergopatie, malattie infettive ed/od infestive, neoplastiche, somministrazione di farmaci e radioterapie: queste possono, dunque, assurgere a causa di geni di coinvolgimenti immunitari, inclusi gli autoimmuni, più o meno clinicamente rilevanti (Stickney et al., 2006; Averbeck et al., 2007; Fukaya et al., 2008; Connors e Britton, 2009; Javela et al., 2009; Treon, 2009, Rafaj et al., 2009).

Le citopenie, ovvero la distruzione degli elementi figurati del sangue, possono occorrere per lisi mediata dal complemento o fagocitosi, delle cellule opsonizzate, da

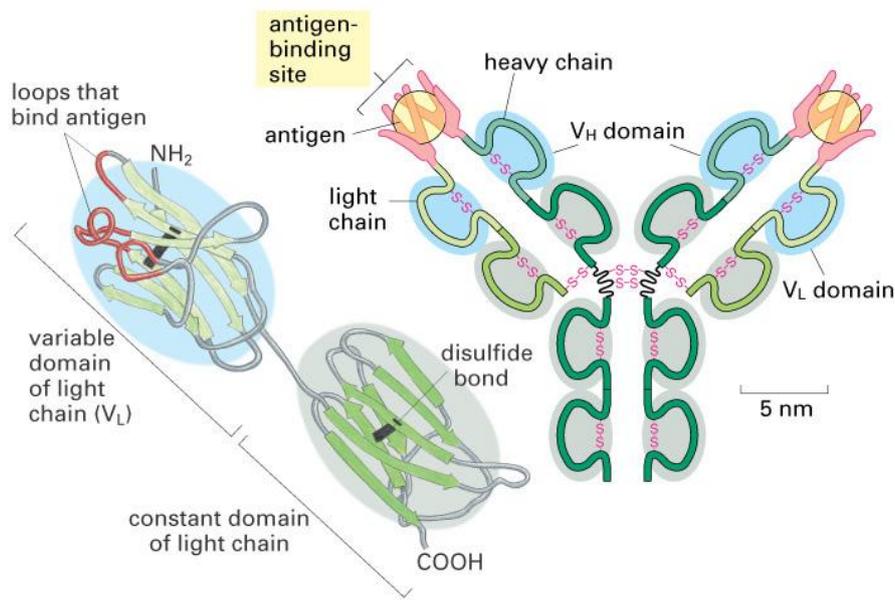
parte del sistema reticolo-endoteliale: a seguire, spesso si osserva una reazione in senso iperplastico da parte del midollo osseo (Spanoudakis e Tsatalas, 2009).

Quando, invece, ad essere bersaglio della reazione abnorme del sistema immunitario sono le cellule progenitrici presenti a livello midollare, le alterazioni ematologiche che verranno osservate si riconosceranno in anemia aplastica, leucopenia, trombocitopenia amegacariocitica od anomalie della maturazione di una o più linee cellulari (Pecci et al., 2009; Trounson, 2009).



Risposta immunitaria.

Raramente, le citopenie risultano essere una conseguenza dell'interazione tra anticorpi e citochine emopoietiche: piuttosto, sono da ritenersi quali esito dell'azione diretta delle immunoglobuline, od anche di cellule della serie bianca, con le cellule oggetto di riduzione nel numero stesse (Gewirtz et al., 1986; Hoffman et al., 1989).

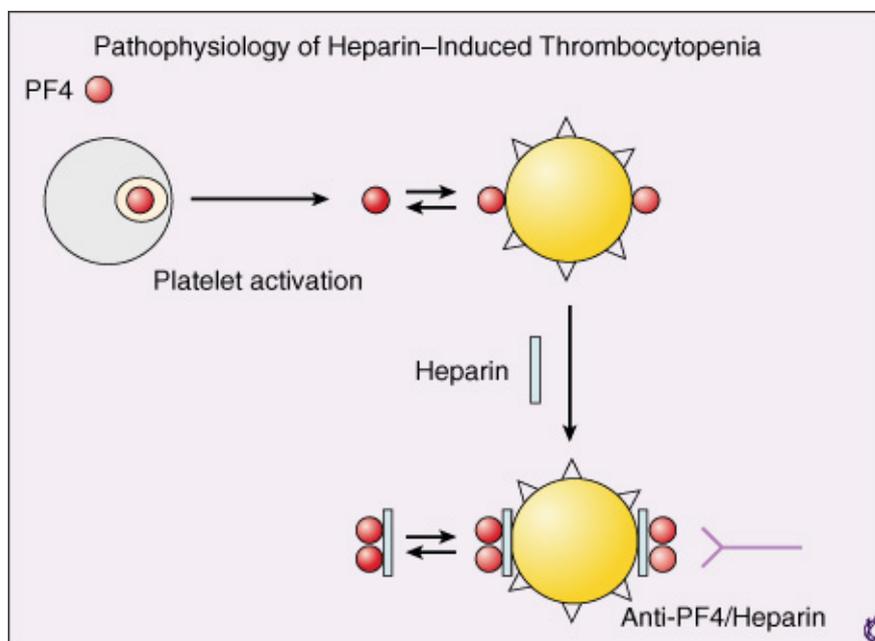


Anticorpo: struttura e particolare.

L'opsonizzazione degli elementi figurati della serie rossa per mezzo del complemento o degli anticorpi può avvenire secondo differenti vie.

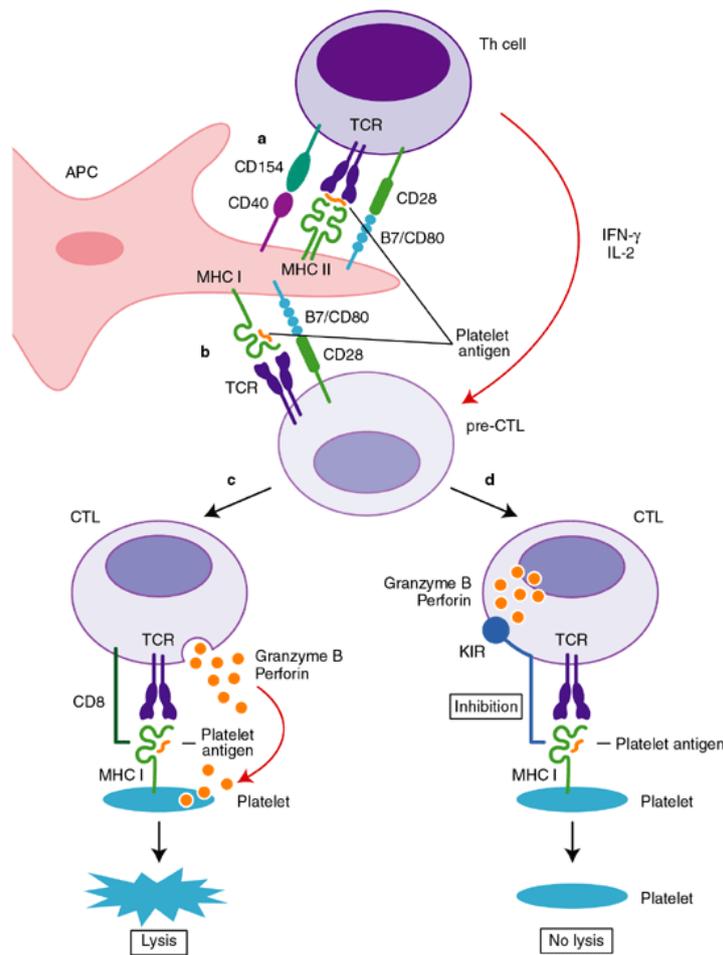
In vero questa può realizzarsi per diretta interazione (*auto* od *allo*)anticorpo-  
(*recettori della*)*cellula*, (*auto* od *allo*)anticorpo-*cellula* mediante *antigeni* sulla  
membrana di questa adsorbiti (*farmaci*, *antigeni microbici*, *antigeni di origine*  
*neoplastica*), (*auto* od *allo*)anticorpo-*membrana danneggiata che presenta*  
*neoantigeni* o *criptoantigeni*, (*auto* od *allo*)anticorpo-*membrana danneggiata che*  
*presenta neoantigeni* o *criptoantigeni* in associazione ad *antigeni adsorbiti* (*farmaci*,  
*antigeni microbici*, *antigeni di origine neoplastica*), *immunocomplesso-recettore* dei  
*neutrofili*, dei *MK* o delle *piastrine* mediata o meno dal *complemento*,  
*immunocomplesso* legato alla membrana mediante azione di *integrine*, *complemento*

*depositato sulla membrana plasmatica* (Dixon e Humprey, 1963; Kunicki e George, 1989; Karpatkin et al., 1992; Ciaramella et al., 2005).



Trombocitopenia eparina-indotta.

Con la definizione di *trombocitopenia immunomediata (IMT)* si suole indicare qualsiasi condizione in cui è contemplato un ridotto numero di piastrine, che si attesta al di sotto dei valori soglia minimi, a causa della distruzione delle stesse ad opera del sistema monocito-macrofagico, ovvero per intervento di anticorpi che aderiscono alla membrana citoplasmatica di queste (Mackin, 1995; Lewis e Meyers, 1996; Scott et al., 2002). Quando tale condizione non risulta essere originata da altre patologie concomitanti, si usa indicarla come *IMT primaria* o *Porpora Trombocitopenica Immunomediata (ITP)* o *Trombocitopenia Autoimmune (AITP)* (Lewis e Meyers, 1996).



### Porpora Trombocitopenica Immunomediata.

Qualora, invece, la trombocitopenia dovesse derivare da qualsiasi altra patologia, sarà da impiegarsi la definizione di *Trombocitopenia Immunomediata Secondaria*: in tale ambito, gli anticorpi associati alle piastrine possono rinvenirsi come legati a specifici antigeni trombocitari di membrana oppure ad antigeni esterni su di quest'ultima adsorbiti (Scott et al., 2002; Ciaramella et al., 2005).

La IMT è un'evenienza da tempo conosciuta nel cane e tutt'altro che remota (Magrane et al., 1959; Gowing, 1964; Putsche e Kohn, 2008; Dircks, 2009).

I primi casi descritti contemplavano la presenza di *Platelet Surface-associated Immunoglobulin (PSA Ig)* (solitamente *IgG*) che si rendevano probabilmente

responsabili della prematura ed esaltata distruzione delle piastrine (normale emivita: 5-9 giorni) (Lewis et al. 1995; Scott, 1995).

Analogamente a quanto accade nell'uomo, rimangono a tutt'oggi non meglio chiarite le cause per le quali si assiste ad (auto)attivazione linfocitaria con conseguente produzione anticorpale, volano dell'anomalo fenomeno trombocateretico immuno-mediato (Beutler et al., 1995; George, 2009).

Sebbene non sembra ben definito il “modello” di paziente con predisposizione allo sviluppo di IMT, è stato osservata una prevalente incidenza della stessa nei cani di razza Cocker Spaniel, con età compresa tra i 6 ed i 7 anni e di sesso femminile (circa doppiamente rappresentato rispetto al maschile) (Wilkins et al., 1973; Jain e Switzer, 1981; Kunicki e George, 1989; Lewis et al., 1995; Scott, 1995; Vargo et al., 2007; George, 2009).

La semeiotica clinica, tipica dell'evento trombocitopenico, inizia a rendersi manifesta dopo circa 3 giorni dall'inizio del fenomeno consuntivo a carico dei trombociti: il dato clinico è, tuttavia, piuttosto aleatorio, riguardo a manifestazione, in quanto suscettibile di ampia variabilità od addirittura assenza per un periodo di tempo della durata finanche di mesi (Wilkins et al., 1973; Williams e Maggio-Price; 1984; Putsche e Kohn, 2008).

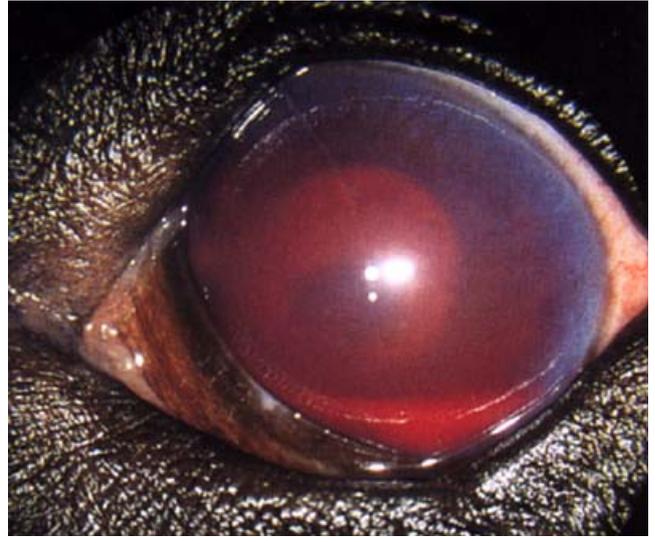
La presentazione del paziente prevede che questi possa anche mostrarsi vigile e normalmente responsivo agli stimoli esterni, a dispetto di una conta piastrinica inferiore alle 3'000 unità/ $\mu$ l (Joschi e Jain, 1976; Halliwell, 1982; Lewis et al. 1995).

I report anamnestici prevedono, frequentemente, episodi di debolezza, anoressia, letargia, epistassi, ematochezia ed emorragie delle mucose (Jackson e Kruth, 1985): spesso la IMT sorgerà a seguito di *discomfort* quali interventi chirurgici, trasporti, climi estremi, variazioni assetto ormonale (gravidanza, pseudociesi, altro) (Dodds, 1983; Jackson e Kruth, 1985).

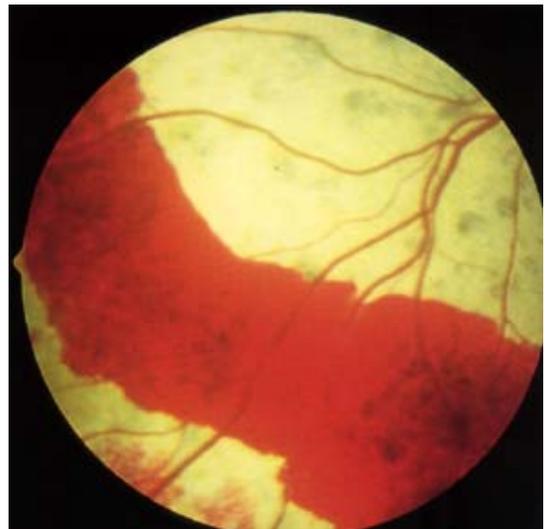
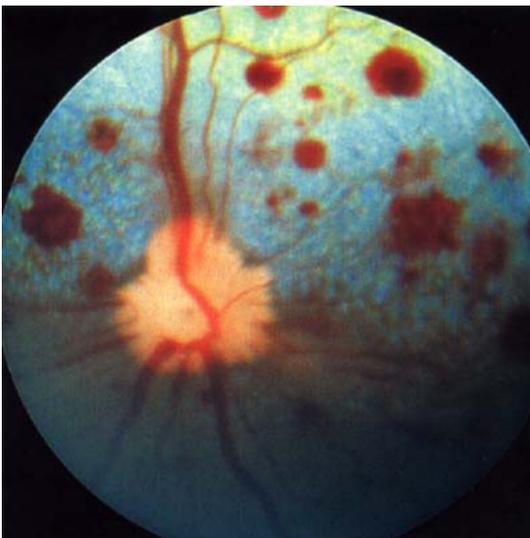


Epistassi.

I reperti più comunemente osservati sono riconosciuti in epistassi, stravasi ematici sottocutanei ed/od intradermici, buccali, vaginali (spesso maggiormente evidenti e gravi in fase estrale), sanguinamenti gastrointestinali (ematemesi, melena, ematochezia), ifema ed emorragie subretiniche, ematuria, epatomegalia, splenomegalia, linfadenopatia, debolezza, anoressia, letargia, collasso (Wilkins et al., 1973; Joshi e Jain, 1976; Jain e Switzer, 1981; Halliwell, 1982; Williams e Maggio-Price, 1984; Jackson e Kruth, 1985; Jain, 1986).



Ifema: presentazione clinica e dettaglio.



Emorragia retinica.



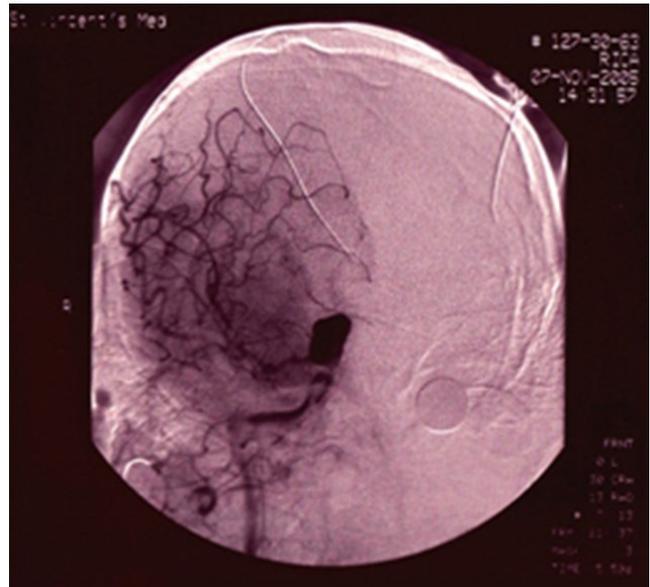
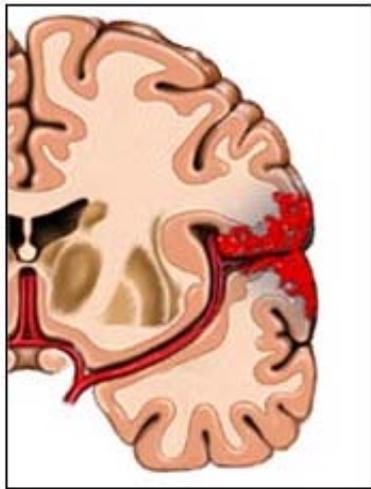
Sanguinamento mucosa gengivale e petecchie mucosa labiale (pallida).

Nondimeno, a livello di cute addominale possono osservarsi segni fortemente suggestivi di trombocitopenia, quali petecchie e stravasi.



Petecchie e stravaso sottocutaneo addome ventrale.

Inoltre, come non infrequenti, vengono riportati episodi di emorragie con localizzazione nervosa centrale, causa di relativa polimorfa sintomatologia ed anche *exitus*.



Emorragia cerebrale: rappresentazione schematica e quadro angiografico.

La diagnosi di IMT può essere emessa soltanto su esclusione (su base anamnestica, clinica, laboratoristica) di ogni altra causa, valida candidata quale innesco di un disordine (auto)immunitario (Wilkins et al., 1973; Jain e Switzer, 1981; Williams e Maggio-Price, 1984; Putsche e Kohn, 2008).

Da un punto di vista di analisi di laboratorio, possono essere condotte diverse considerazioni. Nello specifico, è stato osservato, come accanto al ridotto numero di piastrine circolanti, si rinvenga leucocitosi: tale reperto può suggerire una natura secondaria della trombocitopenia (ad esempio, a condizione infettiva), come anche essere una conseguenza di aspecifica risposta midollare alla flessione della conta dei trombociti od un evento che segue una chemiotassi mediata da fattori (quali PAF o leucotrieni) liberatisi a seguiti di distruzione piastrinica.

Parallelamente, inoltre, può repertarsi anemia (in circa il 20% dei casi): una possibile conseguenza, questa, dello stravasamento od un dato che segnala la concomitanza

di *Anemia Emolitica Immunomediata (Immunomediata Hemolytic Anemia, IMHA)* (Wilkins et al., 1973; Williams e Maggio-Price, 1984; Jackson e Kruth, 1985).

La conferma della diagnosi di IMT nel cane, ci si può avvalere di differenti criteri (Day et al., 2000), ovvero:

1. gravità della trombocitopenia (solitamente grave nella IMT);
2. presenza di microtrombocitosi (presenza nel 50% dei casi di IMT; specificità del 95%);
3. numero normale od aumentato di MK nel midollo osseo [di comune riscontro in corso di IMT, unitamente, talvolta ad aumentato *MPV (Mean Platelet Volume)*];
4. presenza di anticorpi antiplastrine (solitamente IgG; ma la loro presenza non permette di discriminare una IMT primaria da una secondaria) e di *Platelet Factor 3 (PF3)* (rilasciato dalle piastrine danneggiate); immunofluorescenza diretta sui MK, alla ricerca di IgG su di questi legate; citofluorimetria a flusso sulle piastrine, alla ricerca di IgG su di esse presenti; rilevamento delle IgG leganti le piastrine e circolanti nel siero;

5. risposta alla terapia con glucocorticoidi (conta piastrinica responsiva con risultati  $\geq$  di 100'000 unità/ $\mu$ l entro 7 giorni);
6. esclusione di altre cause di trombocitopenia, quali *CID (Coagulazione Intravascolare Disseminata)*, *sindrome uremica emolitica (hemolytic uremic syndrome, HUS)*, *intossicazione da rodenticidi anticoagulanti*, *neoplasie*, *LES (Lupus eritematoso sistemico)*, *IMT da farmaci*, malattie infettive od infestive (*ehrlichiosi, rickettiosi, filariosi, leishmaniosi*), trombocitopenie “*razze-correlate*”.

Le trombocitopenie *secondarie* possono occorrere per processi consuntivi, più o meno acuti (emorragie più o meno profuse, traumi, ustioni: la trombocitopenia è, solitamente, lieve o moderata, temporanea e remissibile senza specifici trattamenti), oppure per fenomeni di natura immunomediata o meno [DIC, *morso di serpente velenoso*, *Porpora Trombocitopenica Trombotica (TTP)*, HUS (questi ultimi due fenomeni sono, nel cane non sono classificabili come frequenti)] (Lee et al., 1993; Beutler et al., 1995).

## LEISHMANIOSI CANINA

La Leishmaniosi canina (*Canine Leishmaniasis, CL*) è una patologia a carattere zoonosico causata da varie specie del genere *Leishmania*, trasmessa da piccoli insetti ematofagi del genere *Sergentomya*, *Warileya*, *Brumptomya*, *Lutzomya* e *Phlebotomus*: questi ultimi sono i soli responsabili della malattia nelle zone endemiche del bacino del Mediterraneo (Scalone et al., 2002; de Andrade, 2007).



Flebotomo.

I parassita del genere *Leishmania* è un protozoo endocellulare, appartenente al phylum *Sarcomastigophora*, classe *Zoomastigophorea*, ordine *Kinetoplastida*, famiglia *Tripanosomatidae*. Esistono numerose specie e sottospecie indistinguibili fra di loro morfologicamente e differenziabili solo per le caratteristiche biochimiche (pattern immunoenzimatici, analisi del DNA mitocondriale), immunologiche ed epidemiologiche (Pampiglione e Canestri Trotti, 1990).

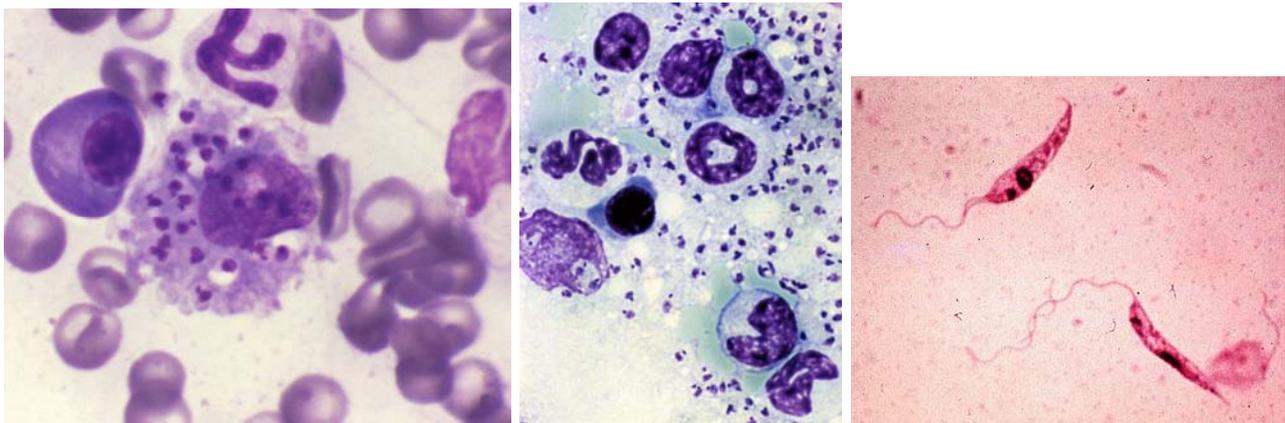
In particolare, le specie presenti in Europa e nel Bacino del Mediterraneo sono la *L. infantum*, *L. tropica* e *L. major*; nel resto del Mondo, risultano diffuse *L. donovani* (Africa, Asia e Russia) e *L. braziliensis* e *L. mexicana* (America Latina).

In Italia, lo *zimodema* responsabile della CL e di quella umana è il *Montpellier I (MONI)* (Gradoni, 1989; Vitale, 2004) e, talvolta, il *MON72* (quest'ultimo, isolato soprattutto da animali provenienti da alcuni comuni dell'area vesuviana).

La *Leishmania* ha un ciclo vitale digenetico, che presenta tre forme principali: amastigote, promastigote e paramastigote, differenziabili per morfologia, rapporti con la cellula ospite ed ospite.

L'*amastigote*, che infetta i vertebrati localizzandosi all'interno delle cellule macrofagiche del sistema reticolo-endoteliale, ha forma ovoidale o tonda ed è privo di flagello; il *promastigote*, che è rinvenuto in sede extracellulare nell'apparato stomatodeale dell'ospite invertebrato, ha forma allungata e presenta flagelli; il *paramastigote* ha morfologia intermedia rispetto alle precedenti, è extracellulare ed infetta faringe, piloro ed ileo degli invertebrati.

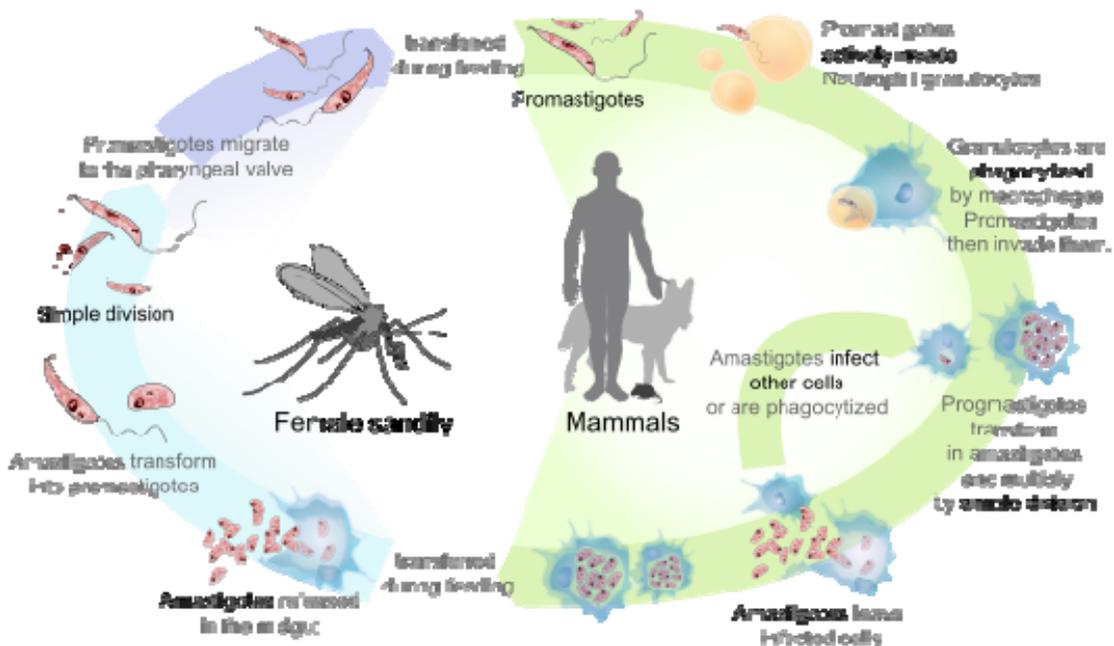
Il ciclo biologico della *Leishmania* nell'ospite vettore si completa in tempi variabili da 4 (*L. mexicana*) a 20 giorni (*L. infantum*). L'amastigote, presente nei macrofagi dell'ospite definitivo, introdotto con il pasto di sangue, si libera e cambia in promastigote in circa 24-48 ore dal pasto stesso. I promastigoti replicano e colonizzano l'intestino medio e, dopo 3 giorni, dall'introduzione nell'ospite intermedio, si trasformano in paramastigoti: questi si moltiplicano per scissione binaria dando luogo a promastigoti sempre più piccoli e molto mobili (promastigoti *metaciclici*) che migrano nella sezione anteriore grazie a stimoli chemio tattici e colonizzano la proboscide dei vettori.



*Leishmania*: amastigoti e promastigoti.

Da qui vengono iniettati in sede cutanea nella cute dell'ospite quando il flebotomo compie un nuovo pasto. Solo i promastigoti metaciclici sono capaci di trasferire l'infezione ai vertebrati. Nel nuovo ospite si comportano da parassiti intracellulari obbligati: vengono fagocitati dalle cellule del sistema reticolo-endoteliale, perdono il flagello e riprendono lo stato di amastigote e, dopo intensa moltiplicazione per scissione binaria, fuoriescono dai macrofagi a seguito della

rottura della membrana di questi. A questo punto, procedono con l'infezione di altre cellule del sistema reticolo-endoteliale (Pampiglione e Canestri Trotti., 1990).



Leishmania: ciclo biologico.

La CL può essere considerata una patologia ubiquitaria, essendo diffusa sia nel Vecchio che nel Nuovo Mondo. I paesi europei maggiormente colpiti sono principalmente quelli che si affacciano sul Mediterraneo, in particolare Spagna, Italia, Francia, Malta, Grecia e Portogallo. In Italia la patologia è diffusa su quasi tutta la fascia costiera ed ad ovest della dorsale appenninica, fino ad altitudini di 500-600 metri. Le regioni più colpite sono al centro-sud, quindi Campania, Calabria, Sicilia, Sardegna, Lazio, Toscana, specialmente nelle aree rurali e periurbane.

La CL riconosce ospiti intermedi, occasionali e definitivi. L'ospite definitivo, principale serbatoio epidemiologico, è il cane (Moreno et al., 2002). Diversi studi

hanno dimostrato che le razze più sensibili sono Beagle, Boxer, Dobermann, Cocker, Spinone, Pastore tedesco. L'incidenza è minore nei soggetti di taglia piccola e ciò sembra essere in relazione all'habitat strettamente domestico, quindi alla minore possibilità di contatto fra vettore ed ospite, specialmente nelle ore notturne (Di Sarno, 1996). Sono più frequentemente colpiti i cani adulti (3-7 anni, con limiti da 1 ad 11 anni), mentre negli anziani la bassa incidenza è legata alla ridotta aspettativa di vita dei soggetti infetti. Altri ospiti serbatoio sembrano essere il ratto nero (Puccini, 1992), la volpe, il lupo e lo sciacallo nelle aree rurali dell'Asia Centrale (Hervàs et al., 1996), lo scoiattolo (Koutinas et al., 2004) e, in alcune regioni dell'Estremo Oriente e dell'Africa orientale, l'uomo.

Gli *ospiti occasionali* sono rappresentati da vertebrati che non hanno ruolo epidemiologico nella diffusione della malattia: canidi selvatici, gatti, roditori, uomini.

Il vettore non ha preferenze su dove effettuare il pasto di sangue, quindi l'incidenza della malattia dipende solo dalla disponibilità di soggetti sensibili nella zona infetta (Maroli, 2005). Solo gli appartenenti al sottogenere *Larrousius* sono sensibili all'infezione da *L. infantum* e possono trasmettere il parassita (Gradoni, 1989). Gli ospiti con infezione clinicamente manifesta sembrano presentare una carica parassitaria cutanea più elevata rispetto ai soggetti oligosintomatici, con conseguente potenziale infettivo maggiore nei confronti dei flebotomi (Travi et al., 2001).

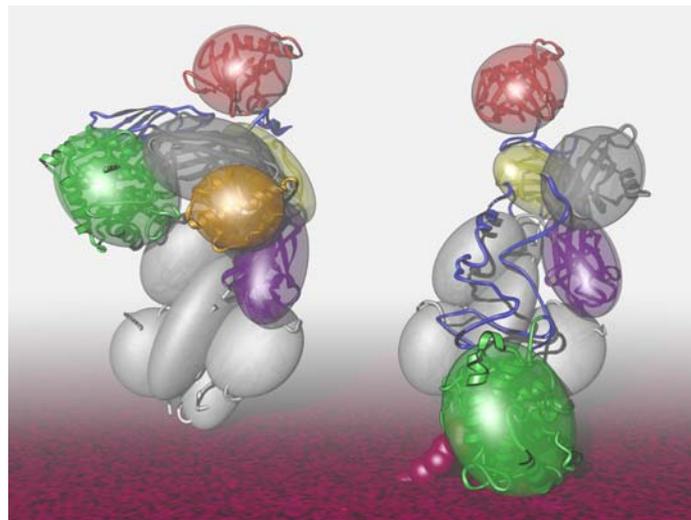
Altre vie di infezione sono rappresentate dalla puntura di zecca, da quella diaplacentare, dalla sessuale e dalla trasfusionale (Gimbo et al., 1994; Silva et al., 2007; Pangrazio et al., 2009).

Il flebotomo punge l'ospite di preferenza nelle zone glabre, ovvero dorso del tartufo ed interno del padiglione auricolare: tali zone presentano, altresì, una temperatura più bassa rispetto agli altri distretti corporei. Ed in queste zone, in tali condizioni, l'attività leishmanicida dei macrofagi è ridotta (Travi et al., 2001).

La saliva inoculata contiene sostanze irritanti che inibiscono la coagulazione ed ostacolano la naturale azione difensiva immunitaria, mentre favoriscono la vasodilatazione (Day et al., 2004): in tal modo vengono a determinarsi locali microemorragie e reazioni pruriginose. Oltre alla saliva, vengono inoculati anche i promastigoti metaciclici, i quali, dopo l'adesione ai recettori di membrana dei monociti [principalmente quelli per le frazioni *CR1* e *CR3* del complemento ed i recettori *mannosio-fucosio* (Marchal et al., 1997; Brittingham et al., 1999)], vengono fagocitati dalle suddette cellule (Santos-Gomes et al., 2000). Nei fagociti, nel giro di 2-5 giorni, si ha la trasformazione ad amastigoti, resistenti all'azione litica e che si moltiplicano per scissione binaria.

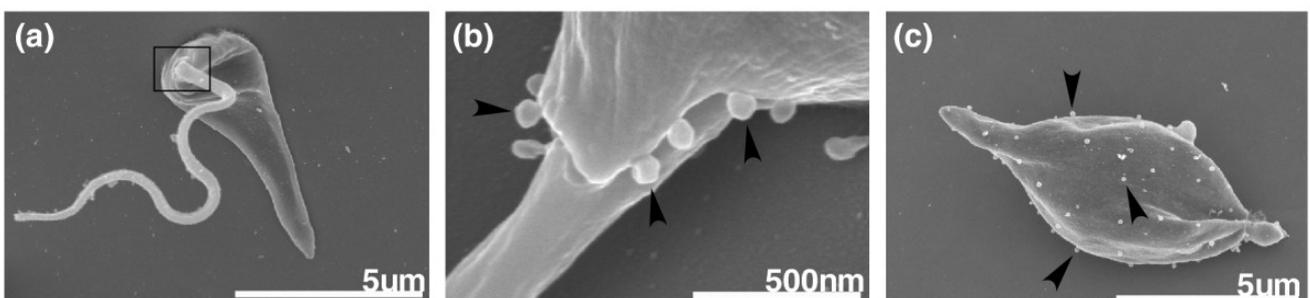
La resistenza della *Leishmania* nell'organismo ospite dipende da diversi fattori protettivi (Corazza et al., 1999). Innanzitutto, la membrana dei promastigoti è ricoperta da un glicocalice formato da glicoproteine, quali i *lipofosfoglicani* ed la *gp 63*, che rappresentano un importante mezzo di resistenza nei confronti dell'attività immunitaria. I lipofosfoglicani, oltre a proteggere il parassita dalle idrolasi e dai

radicali dell'ossigeno dell'ospite, hanno la capacità di attivare il complemento fissando la frazione C3, in modo da facilitare la fagocitosi e quindi ridurre la permanenza nell'ambiente extracellulare, dove sono presenti anticorpi e complemento attivo.



Frazioni C3 e C3b del complemento.

Inoltre, all'interno della cellula macrofagica, i lipofosfoglicani ritardano la fusione tra fagosoma e lisosoma ed inibiscono il *burst ossidativo*, inattivando la *p-galattosidasi lisosomiale* e la *proteinchinasi C* (Brandonisio et al., 1996).



Leishmania: promastigote [(a) e (b), regione flagellare e particolare] ed amastigote: vescicole di esocitosi.

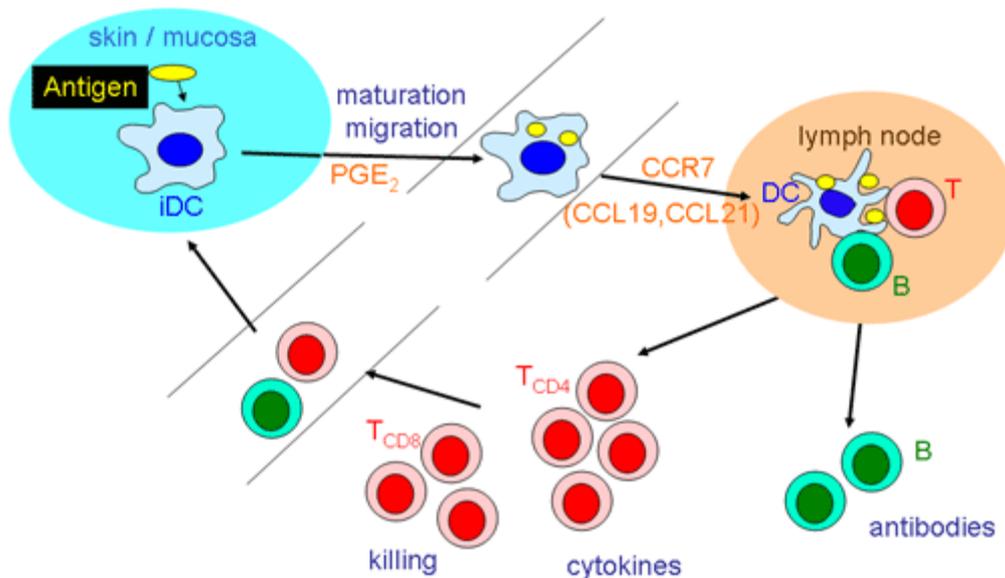
La gp 63 è una *zincometalloproteinasi* che inattiva gli enzimi proteolitici ed impedisce la degradazione fagolisosomiale; inoltre, la sua interazione con i recettori per la fibronectina permette la fagocitosi macrofagica (Brittingham, 1999).

La forma amastigote resiste meglio all'aggressione enzimatica ed all'ambiente acido, perché sulla membrana presente una pompa  $H^+$ -ATPasica, che espelle i protoni dal citoplasma del parassita; l'amastigote possiede anche dei *glicosfingolipidi* ad azione protettiva e, inoltre, è dotato di *catalasi*, *superossido-dismutasi* e *glutazione per ossidasi*, che neutralizzano gli enzimi ossidativi. Infine, sembra che l'amastigote elimini localmente una sostanza ad azione antienzimatica, detta *fattore escretore*.

Amastigoti e promastigoti sono in grado di opporsi agli anticorpi sierici specifici agganciandoli mediante gli antigeni di superficie e poi eliminandoli sotto forma di immunocomplessi ed hanno la capacità di ricostituire, con un turnover breve (3,5-4 ore), gli antigeni andati perduti.

La cute è il sito primario di infezione e la sede dello sviluppo della flogosi a carattere granulomatoso assume l'aspetto di una piccola papilla eritematosa e pruriginosa (lesione primaria). Sembra che la regione coinvolta sia il derma, non essendo possibile la localizzazione del parassita al di sopra della giunzione dermo-epidermica (Marchal et al., 1997). I parassiti possono rimanere localizzati a livello cutaneo (forma cutanea), oppure guadagnare una diffusione sistemica ad opera del sistema reticolo-endoteliale, con interessamento del midollo osseo (Simpson et al., 1982), fegato, milza, linfonodi e sottomucosa intestinale (forma viscerale). La disseminazione sistemica della *Leishmania* è mediata dalla migrazione verso i

linfonodi dei macrofagi parassitati (Santos-Gomes et al., 2000). Queste cellule, unitamente alle cellule dendritiche ed ai cheratinociti, assumono la funzione di presentare l'antigene (*Antigen Presenting Cell, APC*) ai *linfociti T helper*.



Cellule dendritiche, macrofagi e linfociti.

È possibile assistere alla neutralizzazione istantanea del parassita se è attivata un'efficiente azione delle cellule *Natural Killer (NK)*, che distruggono il protozoo appena inoculato (risposta innata), ma più frequentemente si stabilisce un temporaneo stato di equilibrio tra agente infettivo e sistema immunitario, in cui la *Leishmania* è allo *stato latente* e pronta a determinare malattia in corrispondenza di cali dell'efficienza del sistema immunitario dell'ospite.

L'evoluzione dell'infezione è strettamente connessa al tipo di risposta immune innescata, in particolare è legata all'attività delle popolazioni di *linfociti T*,  $CD4^+$  e/o  $CD8^+$ , responsabili del riconoscimento degli antigeni presentati dai macrofagi.

Nell'ambito della popolazione di linfociti CD4<sup>+</sup>, si riconoscono due fenotipi: *T helper 1 (Th1)* e *T helper 2 (Th2)*. Poiché la *Leishmania* è un parassita intracellulare obbligato, la resistenza dell'ospite è in funzione della presenza dell'attività di macrofagi maturi, stimolati dalle citochine di tipo 1 ed in particolare dall'*Interferone  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )* (Marchal et al., 1997). I Th1, producendo IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , determinano lo sviluppo di una *risposta cellulo-mediata* citotossica protettiva nei confronti del parassita e, in minima parte, di un'immunità umorale, rappresentata da una ristretta classe di IgG; di conseguenza, si assisterà ad un'evoluzione asintomatica dell'infezione e titoli anticorpali bassi.

I Th2, invece, producono IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, *B cell stimulating factor (BSF) -1*, con stimolazione di una risposta umorale (differenziazione dei linfociti B e produzione di anticorpi IgG, IgE ed IgA) non protettiva, perché prodotti da macrofagi immaturi e con ridotto potenziale antiparassitario; in questo caso, quindi, saranno evidenti i segni clinici della malattia, nonostante gli alti titoli anticorpali (Day, 2004). Infatti, sembra che l'IL-3 promuova la cronicizzazione della patologia, mentre l'IL-4 faciliti la moltiplicazione del parassita e determini una rapida crescita della lesione seguente la puntura del flebotomo (Marchal et al., 1997).

I fattori che inducono una risposta prevalentemente Th1 o Th2 non sono del tutto conosciuti: nella maggior parte dei casi possono essere formulate solo delle ipotesi. Alcuni fattori dipendono dall'ospite, altri, invece dal parassita e dalla sua attività.

Nell'ospite, l'attivazione della risposta Th1 dipende dall'IL-12: infatti, la prevalente produzione di tale citochina da parte delle APC (soprattutto *cellule di Langherans*) (Marchal et al., 1997) dopo l'interazione con il parassita, favorisce lo sviluppo dei linfociti Th1; al contrario, l'elaborazione in massima parte dell'IL-4, induce sviluppo del fenotipo Th2.

Recentemente, tuttavia, è stata portata alla luce una seconda via di attivazione della risposta Th1 IFN- $\gamma$ -dipendente. A determinare la produzione di IFN- $\gamma$  sarebbero le citochine IL-27, IL-23, IFN- $\alpha/\beta$ , in sinergia con l'IL-18, oppure linfociti CD38<sup>+</sup>.

È stata ipotizzata una predisposizione genetica multifattoriale che riconoscerebbe la presenza di soggetti geneticamente resistenti e di altri geneticamente recettivi. Esperimenti condotti su topi BALB/c (recettivi) dimostrano che la predisposizione dipende dal legame fra gli epitopi antigenici di *Leishmania*, in particolare il *LACK* (*Leishmania-Activated C Kinase*) ed una determinata popolazione di linfociti T CD4<sup>+</sup> che esprime i recettori V $\beta$ 4-V $\alpha$ 8; tale legame porta ad un'abnorme produzione di IL-4 e, dunque, allo sviluppo eccessivo del clono linfocitario Th2, mentre la produzione di IL-12 da parte delle APC risulta assente od alterata. L'IL-4 inibisce la risposta all'IL-12 da parte dei precursori delle cellule T CD4<sup>+</sup> attraverso un meccanismo di feed-back negativo (Louis et al., 1998). Altri studi indicano che sarebbero geneticamente resistenti *in vitro* i topi con *pathway* citotossico *Fas* (*recettore FAS* o *recettore di morte FAS* è un recettore della membrana cellulare che, se attivato da specifici ligandi induce apoptosi; fa parte della grande famiglia dei *recettori TNFR* caratterizzati da un dominio di morte

intracellulare) integro (Louis et al., 1998). In seguito ad esperimenti sul genoma, si ipotizza che nei cani sensibili sia significativamente maggiore l'espressione dell'allele 145 del gene codificante per la molecola *NRAMP1*, sostanza coinvolta nell'attivazione macrofagica e nel controllo della replicazione parassitaria nel fagosoma (Day, 2004). Studi sulla popolazione canina in Brasile hanno suggerito una correlazione fra la sensibilità e la presenza dell'allele DLA-DRB1\*01502 nei geni codificanti per il *Complesso Maggiore di Istocompatibilità classe II (MHC II)* (Day, 2004).

Importanza di primo piano è da attribuire alla storia clinica del paziente infetto, poiché negli stati allergici si ha attivazione dei *granulociti eosinofili*, che stimolano soprattutto una risposta Th2; gli stati immunodepressivi, dovuti a radioterapie, chemioterapie, infezioni da Ehrlichia, Babesia ed altre, possono causare uno *switch* della risposta immunitaria Th1 a Th2, favorendo la comparsa della malattia (Ferrer, 2004). Non di rado, la CL si associa a malattie infettive quali la già citata Ehrlichiosi.

Per quanto riguarda i fattori dipendenti dall'attività parassitaria, la Leishmania agirebbe sulla sintesi di citochine da parte del macrofago invaso con azione immunomodulatrice a favore dei Th2; inoltre, il sequestro degli antigeni del MHC II nei vacuoli parassito fori indurrebbe minore esposizione di membrana e, quindi, maggior attivazione dei linfociti Th2.

I lipofosfoligandici di membrana dei promastigoti appaiono essere responsabili dell'elusione della secrezione di IL-12 e, quindi, della risposta cellulo-mediata. Infine, quantità elevate di parassiti indurrebbero maggior sviluppo dei linfociti Th2

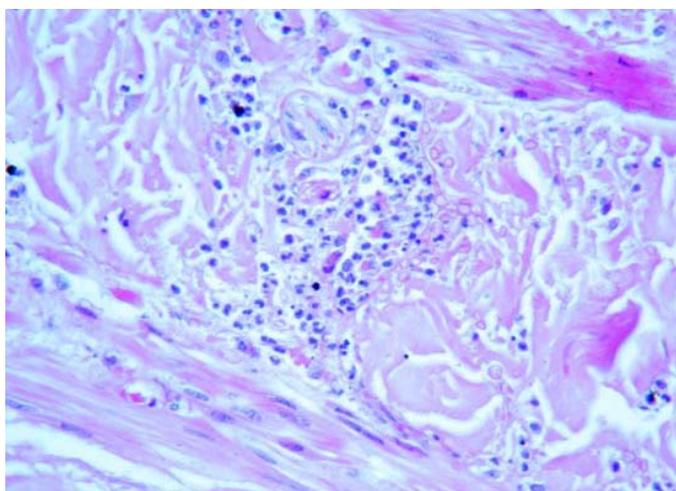
indipendentemente dalla via di infezione, dal tipo di patogeno e dall'ospite (Meno et al., 1998).

Anche il vettore assume un ruolo di data importanza, in quanto si ipotizza che i prodotti delle ghiandole salivari del flebotomo inibiscano l'IFN- $\gamma$ , l'IL-12 e l'*iNOS* (*inducible nitric oxide synthase*), essenziale per la distruzione dei parassiti intracellulari, mentre sembra favoriscano la produzione di IL-4 (Mbow et al., 1998).

La *Leishmania* determina una continua sollecitazione delle cellule immuni competenti, con conseguente squilibrio immunitario, caratterizzato da iperstimolazione della risposta umorale ed anomalie di quella cellulo-mediata. Di conseguenza, il soggetto infetto presenterà disprotidemia, patologie da immunocomplessi e da autoanticorpi, nonché immunodepressione.

La disprotidemia è conseguenza dell'iperproduzione anticorpale avviata dai linfociti B eccessivamente stimolati dalle linfochine macrofagiche e dall'azione antigenica continua: si osserverà, dunque, aumento delle  $\gamma$  globuline di tipo policlonale e quindi inversione del normale rapporto albumine/Globuline (v. n.: 1-1.5) che va aggravandosi per il conseguente danno epatico. La proliferazione eccessiva dei linfociti B, insieme all'aumento degli eosinofili, plasmacellule, macrofagi ed istiociti, probabilmente è la causa dell'iperplasia generalizzata dei tessuti linfoidi (linfonodi, milza e, meno frequentemente, fegato) tipica di questa patologia (Day, 2004), ma anche della produzione di immunocomplessi ed autoanticorpi.

La *Leishmania* aggancia gli anticorpi attraverso i propri antigeni di membrana e li elimina sotto forma di immunocomplessi che, una volta in circolo, si depositano sulle membrane basali in vari distretti organici, rendendosi responsabili di vasculite, polmonite interstiziale, poliartrite, uveite, sinovite, emorragie, disturbi nervosi, ulcerazioni muco-cutanee, glomerulo nefrite (Day, 2004; Bonfanti e Zatelli, 2004), fino all'insufficienza renale, prima causa di morte dei cani leishmaniotici.



Vasculite: istologia.

Probabilmente, in seguito a reazione crociata fra antigeni parassitari ed antigeni *self*, sono prodotti anticorpi responsabili di manifestazioni autoimmuni quali anemia e trombocitopenia. Nel cane, sono stati evidenziati anticorpi anti-nucleo (*ANA*), anti-muscolo liscio, anti-muscolo cardiaco ed anti-eritrociti ed è stato dimostrato che, al pari di quanto accade nell'uomo, sono presenti anche anticorpi anti-piastrine (Day, 2004; De Luna et al., 1995; Terrazzano et al., 2006).

Lo stato di immunodepressione favorisce l'instaurarsi di infezioni quali Ehrlichiosi, Demodicosi, Babesiosi, Emobartonellosi, Epatozoonosi e Dirofilariosi, di

infezioni cutanee, di Epatite cronica attiva e di enterite linfoplasmacellulare (Ciaramella et al., 1997; Ferrer, 2004). Più rare risultano le associazioni con neoplasie (linfoma multicentrico, emangiosarcoma) e con patologie endocrine (ipotiroidismo) (Oliva, 2004).

La predisposizione alla diatesi emorragica (soprattutto sotto forma di epistassi) osservata nei cani leishmaniotici ha come causa, oltre alle ulcere nasali, la paraglobulinemia che può interferire, insieme all'uremia, con la polimerizzazione della fibrina e con la funzione dei trombociti. Un'altra ragione può essere rappresentata da trombocitopatia o trombocitopenia da autoanticorpi, da immunocomplessi (Margarito et al., 1998), da insufficienza nel midollo osseo o da sequestro splenico.

L'anemia si sviluppa come una conseguenza della minore eritropoiesi midollare tipica della malattia cronica (Slappendel, 2002), ma può essere aggravata da diatesi emorragica, da condizioni autoimmuni (anticorpi anti-eritrociti) e da fenomeni immunomediati, con diminuzione anticorpo-correlata della sopravvivenza dei globuli rossi (accentuata attività emocateretica splenica sui globuli rossi opsonizzati). A latere, è da considerare anche il ruolo di radicali liberi nel determinare danno della membrana eritrocitaria, favorendone la demolizione da parte del sistema reticolo-endoteliale (Biswas et al., 1992; Severino et al., 1998).

Il decorso clinico della malattia è, in genere, subacuto-cronico, ma nel circa 4% dei casi è possibile osservare una fase acuta con assenza di sintomi cutanei, comparsa

di linfadenomegalia generalizzata e febbre alta (40-40.5 °C), remittente od intermittente, che colpisce quasi esclusivamente i giovani o soggetti già debilitati.

Altri segni rilevabili nella fase acuta sono anoressia, abbattimento, dimagrimento, enterite, iperestesia, paresi, paralisi, tremori diffusi (Ciaramella et al., 1997). La fase cronica si manifesta in meno del 50% dei cani infetti (Oliva, 2004), con sintomi vaghi, ma che divengono progressivamente più decisi e gravi (Ciaramella et al., 1997).

Nei cani malati, il polimorfismo sintomatologico rende, in taluni casi, la diagnosi clinica particolarmente impegnativa. Infatti, accanto ai classici segni di CL, quali linfadenomegalia, splenomegalia, dermatite furfuracea, onicogirfosi, uveite, cheratite, blefarite, negli ultimi anni sono stati descritti aspetti clinici meno comuni (che possono rappresentare, tra l'altro, le uniche manifestazioni cliniche), quali, ad esempio, coliti (Ferrer et al., 1991), panoftalmiti (Ciaramella et al., 1994), piogranulomi cutanei (Santoro et al., 2008), artrosinoviti, glossiti (Cucinotta et al., 1995; Bracco et al., 1997).

Molti di questi segni si possono accompagnare a sanguinamento: epistassi, ematuria, colite emorragica (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999) e CID (Font et al., 1994).



Leishmaniosi: alopecia labiale, depigmentazione ed ulcere del tartufo; ulcere dei cuscinetti plantari.



Leishmaniosi: dermatite furfuracea; cheratocongiuntivite.

Nei soggetti leishmaniotici, le anomalie della coagulazione si esprimono clinicamente con epistassi, ematuria, colite emorragica, fenomeni trombo embolici (Ferrer et al., 1991; Binhazim et al., 1992; Font et al., 1994; Ciaramella et al., 1997).

Le alterazioni emostatiche sono legate alla gravità dei segni clinici (Ciaramella et al., 2005). I meccanismi patogenetici alla base di tali alterazioni risultano essere molto complessi e non del tutto chiariti. Si è supposto che nella prima fase, il parassita interagisca direttamente con le piastrine attraverso un meccanismo chiamato

“aderenza immune”, che porta alla formazione di ampi aggregati (Dominguez e Toraño, 2001). Si riconosce anche la possibilità che il danno indotto dai protozoi sui recettori di membrana porti alla formazione di antigeni riconosciuti come *non-self* e quindi all’attivazione di un processo immunomediato (Ciaramella et al., 2005). Di conseguenza, la trombocitopenia e la trombocitopatia potrebbero essere causate dall’azione di autoanticorpi anti-membrana piastrinica (Terrazzano et al., 2006), oppure dalla deposizione di immunocomplessi antigene-anticorpo circolanti che, depositandosi negli endoteli vasali e sulle membrane piastriniche, avviano un processo emocoagulativo anomalo (Margarito et al., 1998) od, ancora, essere secondari sia a problemi immunomediati che a danno renale e/o epatico (Ciaramella et al., 2005).

Il danno renale potrebbe essere anche responsabile della riduzione della piastrinopoiesi in quanto è stato osservato che, *in vitro*, l’eritropoietina stimola anche la crescita dei MK (Jain, 1993). La riduzione dell’aggregazione piastrinica può essere il risultato di anomalie biochimiche come l’aumento della produzione di prostaciline e di ossido nitrico da parte degli endoteli dei vasi renali, che induce un incremento di AMP<sub>c</sub> endopiastrinico e, quindi, una riduzione della reattività trombocitica (Kyrle et al., 1988; Noris et al., 1993).

Altre cause di trombocitopenia e trombocitopatia possono essere l’insufficienza renale ed epatica, l’alterata mielopoiesi, le vasculiti sistemiche e/o la maggiore distruzione piastrinica, con aumento del sequestro splenico (Slappendel, 2002; Day, 2004).

Il riscontro di trombocitopenia, trombocitopatia, incremento del *tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT)*, del *tempo di trombina (TT)* e dei *prodotti di degradazione della fibrina (FDP)*, indica che sia l'emostasi primaria che quella secondaria che il processo di fibrinolisi sono coinvolti nel processo patogenetico di tale affezione (Font et al., 1993, 1994; Moreno, 1999). Inoltre è possibile rilevare CID (per danno diretto del parassita a livello endoteliale e/o alla precipitazione di immunocomplessi nella parete dei vasi) e forme compensate di tale evenienza in animali sperimentalmente infetti (Font et al., 1994).

## PARTE SPERIMENTALE

## MATERIALI E METODI

Per il presente studio, sono stati reclutati 44 cani meticci, di età variabile tra i 3 ed i 10 anni, di ambo i sessi (26 maschi e 18 femmine), naturalmente infetti da *Leishmania infantum* e residenti nella regione Campania.

I soggetti, nessuno dei quali aveva anamnesi di manifestazioni emorragiche, sono stati divisi in due gruppi:

1. gruppo “A”: 20 cani con conta piastrinica  $< 150'000$  unità/ $\mu$ l;
2. gruppo “B”: 24 cani con conta piastrinica  $> 200'000$  unità/ $\mu$ l.

La diagnosi di leishmaniosi, emessa sulla base dell'esame clinico, veniva in tutti i casi confermata dalla presenza degli amastigoti a seguito di mielogramma ed adenogramma. La sieropositività all'esame *IFAT* (*Immunofluorescent Antibody Test*),

per ogni soggetto, era  $\geq 1/160$  e nessuno di questi aveva mai ricevuto specifica terapia per leishmaniosi. Il reclutamento dei soggetti inclusi nella ricerca veniva, inoltre, effettuato escludendo la presenza di altre entità nosografiche infettive causa di trombocitopenia secondaria, quali ehrlichiosi, babesiosi, anaplasmosi e filariasi cardiopolmonare. A tale scopo, veniva condotte analisi IFAT e PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e ricerca su striscio di sangue periferico delle *morule* di *Ehrlichia canis* e *Anaplasma phagocytophilum*, dei *trofozoiti* di *Babesia canis* e delle *microfilarie* di *Dirofilaria immitis*. Di quest'ultima, infine, ne veniva esclusa la presenza mediante impiego di *Snap Canine Combo Heartworm Antigen Antibody Test* (IDEXX Laboratories).

Dieci soggetti clinicamente sani e negativi per tutte le precedentemente menzionate malattie infettive, costituivano il *gruppo di controllo*.

I campioni di sangue venivano collezionati, dopo un periodo di digiuno di 12 ore, in provette contenenti *sodio citrato* al 3.8%: a seguito di ciò, entro 30 minuti dal prelievo, si procedeva ad eseguire esame emocromocitometrico completo con contaglobuli semiautomatico ("Genius S", SEAC Random Group) e ad allestire strisci su vetrino, onde escludere la presenza di aggregati piastrinici.

Si è provveduto, altresì, ad ottenere campioni di siero, mediante centrifugazione a 300 g per 15 minuti entro un'ora dal prelievo, e stocarli a temperatura di -20°C fino al momento della processazione mediante citometria a flusso.

Parimenti, dal gruppo di controllo si è provveduto a prelevare campioni di sangue in provette contenenti *EDTA* (*Ethylene-Diamino-Tetraacetic Acid*) e sottoporli a centrifugazione a 300 g per 10 minuti a 20°C (Kristensen et al., 1994).

Il plasma ricco in piastrine veniva trasferito in provette dove subiva triplice lavaggio con *PBS* (*Phosphate Buffered Saline*) contenente 3nM di EDTA e l'1% di albumina sierica bovina (*PBS-EDTA-BSA*).

Dopo i lavaggi, le piastrine sono state accomodate ad una concentrazione di  $40 \times 10^8$  cellule/ml ed impiegate per test di immunofluorescenza.

Ogni determinazione era eseguita impiegando nuove piastrine isolate all'occorrenza.

Una sospensione di piastrine di 20 µl veniva messa ad incubare in provette di plastica (*Falcon, Becton Dickinson*) per 30 minuti a temperatura ambiente con 20 µl di siero diluito 1:10 proveniente dai cani dei tre gruppi. Dopo due lavaggi con *PBS-EDTA-BSA*, le piastrine venivano incubate per 30 minuti con una soluzione diluita 1:20 di siero ovino con anticorpi anti-piastrine di cane marcati con FITC (*Bethyl Laboratories*).

Le piastrine sono state vagliate e selezionate mediante parametri FSC e SSC (Kristensen et al., 1994).

La citometria a flusso e l'analisi dei dati sono state eseguite avvalendosi di citofluorimetro a due laser *FACScalibur* e programma *CellQuest* (*Becton Dickinson*).

Venivano, in seguito, considerati positivi i campioni con più del 30% delle piastrine mostranti un'intensità media di fluorescenza (MFI) di 100 canali maggiore del controllo negativo.

L'analisi dei dati è stata condotta mediante *test di Fisher*: venivano considerati significativi i risultati con  $p < 0.05$ .

Si è provveduto, inoltre, alla determinazione della concentrazione delle sieroproteine totali (PT) ed all'elettroforesi delle stesse, con analisi delle concentrazioni delle frazioni delle albumine e delle globuline alfa (alfa<sub>1</sub> ed alfa<sub>2</sub>), beta (beta<sub>1</sub> e beta<sub>2</sub>) e gamma, nonché valutazione del rapporto Albumine/Globuline (A/G): in seguito, i dati riguardanti le concentrazioni delle beta e delle gamma-globuline, di entrambi gruppi di animali oggetto di studio, sono stati analizzati mediante *test t di Student*.

## RISULTATI

La conta piastrinica dei soggetti infetti variava da un minimo di  $60 \times 10^9$  unità/l ad un massimo di  $136 \times 10^9$  unità/l per il gruppo A, nonché da un minimo di  $206 \times 10^9$  unità/l ad un massimo di  $395 \times 10^9$  unità/l per il gruppo B, con una media di  $98.8 \times 10^9$  unità/l per i soggetti del gruppo A ed una media di  $275.65 \times 10^9$  unità/l per i soggetti del gruppo B. Tra i soggetti con un numero di trombociti inferiore a  $150 \times 10^9$  unità/l, alcuni (6 cani) presentavano anemia normocromica normocitica da lieve a moderata, altri (5 cani) anemia normocromica microcitica. Tra i soggetti con conta piastrinica superiore a  $200 \times 10^9$  unità/l, alcuni (2 cani) presentavano lieve anemia normocromica normocitica, mentre uno solo lieve anemia ipocromica normocitica.

Il gruppo di controllo mostrava profilo emocitometrico normale.

Tabella 1. Gruppo A: risultati esame emocromocitometrico e citofluorimetrico in animali trombocitopenici.

Cane	WBC (x10 <sup>9</sup> /l)	RBC (x10 <sup>12</sup> /l)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (%)	MCH (%)	MCHC (g/l)	Plt (x10 <sup>9</sup> /l)	PBIgM	PBIgG
1	6.4	3.3	8.0	22.7	68	24.2	35.2	88	-	-
2	10.5	6.0	14.4	42.6	70	23.6	33.7	128	+	+
3	7.2	5.7	12.7	37.2	65	22.2	34.2	132	++	+
4	8.8	5.7	14.1	40.1	70	24.8	35.2	79	+	-
5	11.3	6.2	15.4	43.5	70	24.7	35.3	114	+	+
6	6.2	3.8	8.0	22.3	58	21.0	35.8	134	++	++
7	11.5	4.1	7.9	23.0	56	19.3	34.5	115	++	++
8	7.9	4.5	10.2	29.2	65	22.9	35.1	101	+	-
9	10.0	4.4	10.3	28.9	65	23.1	35.5	95	++	+
10	12.4	6.5	14.3	38.0	59	22.1	37.6	60	++	++
11	10.3	5.8	11.8	33.5	59	20.4	35.2	124	++	++
12	10.1	6.2	12.7	35.4	57	20.6	35.9	68	++	+
13	7.9	4.7	9.9	27.3	58	21.0	36.2	100	++	++
14	7.7	6.9	15.1	42.2	61	21.7	35.8	95	++	++
15	9.8	7.6	16.9	46.0	61	22.3	36.7	65	++	+
16	8.2	8.0	18.8	49.2	62	23.5	38.2	62	++	++
17	9.6	8.2	19.8	48.1	60	24.1	41.1	136	++	++
18	9.7	7.0	16.2	42.0	60	23.1	38.5	89	++	++
19	9.9	6.0	12.4	36.7	61	20.5	33.7	61	++	+
20	4.9	4.8	10.3	28.9	60	21.6	35.7	130	++	++

“+” e “++”: campioni contenenti, rispettivamente, oltre il 30% od il 50% di piastrine, mostrandoti MFI di almeno 100 canali più elevata (su scala logaritmica) rispetto al campione di controllo.

WBC: leucociti; RBC:eritrociti; Hb: emoglobina; Hct: ematocrito; MCV: volume corpuscolare medio; MCH: contenuto emoglobinico corpuscolare medio; MCHC: concentrazione emoglobinica corpuscolare media; Plt: piastrine; PBIgM: IgM leganti le piastrine; PBIgG: IgG leganti le piastrine.

Tabella 2. Gruppo B: risultati esame emocromocitometrico e citofluorimetrico in animali non trombocitopenici.

<b>Cane</b>	<b>WBC</b> (x10 <sup>9</sup> /l)	<b>RBC</b> (x10 <sup>12</sup> /l)	<b>Hb</b> (g/dl)	<b>Hct</b> (%)	<b>MCV</b> (%)	<b>MCH</b> (%)	<b>MCHC</b> (g/l)	<b>Plt</b> (x10 <sup>9</sup> /l)	<b>PBIgM</b>	<b>PBIgG</b>
<b>21</b>	13.0	6.1	12.0	39.6	65	19.6	30.3	395	+	-
<b>22</b>	9.1	5.4	10.0	36.4	67	18.5	27.5	210	-	-
<b>23</b>	5.8	5.3	13.2	35.9	67	24.8	36.8	212	++	-
<b>24</b>	8.9	6.8	18.1	47.9	69	26.3	37.9	221	-	-
<b>25</b>	5.9	7.0	17.4	46.0	65	24.7	37.8	238	-	-
<b>26</b>	11.5	5.3	12.9	35.2	67	24.5	36.6	220	-	-
<b>27</b>	11.1	6.9	17.8	44.8	64	25.0	39.7	211	+	+
<b>28</b>	7.0	6.3	14.8	41.0	64	23.2	36.0	206	+	-
<b>29</b>	9.2	6.7	16.1	44.2	65	23.8	36.5	220	-	-
<b>30</b>	8.2	5.7	12.0	38.1	66	21.0	31.4	296	+	+
<b>31</b>	11.8	5.3	13.2	35.9	67	24.8	36.8	240	+	-
<b>32</b>	11.2	7.0	17.1	47.6	67	24.3	36.0	235	+	-
<b>33</b>	8.9	6.6	17.2	43.8	66	26.1	39.4	320	-	-
<b>34</b>	8.7	6.6	15.5	42.4	63	23.1	36.4	220	+	+
<b>35</b>	11.6	6.7	16.8	46.0	68	24.9	36.6	352	+	-
<b>36</b>	5.8	7.7	18.5	53.1	69	24.0	34.9	273	+	-
<b>37</b>	16.8	5.3	13.2	35.9	67	24.8	36.8	256	+	-
<b>38</b>	11.0	5.7	11.8	39.3	68	20.7	30.0	368	-	-
<b>39</b>	9.3	6.9	16.4	44.1	64	23.6	37.1	263	+	-
<b>40</b>	10.7	6.5	16.7	43.7	67	25.6	38.1	339	-	-
<b>41</b>	8.3	6.9	16.7	46.1	67	24.4	36.2	256	-	-
<b>42</b>	10.6	5.6	13.8	36.7	65	24.5	37.0	248	-	-
<b>43</b>	10.5	5.9	13.8	39.9	68	23.4	34.6	286	++	-
<b>44</b>	11.0	7.2	12.9	46.6	65	28.5	43.9	293	-	-

Tabella 3. Gruppo A: quadro proteico elettroforetico.

<b>Cane</b>	<b>PT</b>	<b>Albumine</b>	<b>Globuline</b>	<b>A/G</b>	<b>Alfa<sub>1</sub></b>	<b>Alfa<sub>2</sub></b>	<b>Beta<sub>1</sub></b>	<b>Beta<sub>1</sub></b>	<b>Gamma</b>
<b>1</b>	8.0	3.1	4.9	0.63	0.3	0.6	1.0	0.9	2.1
<b>2</b>	8.3	3.2	5.1	0.62	0.3	0.6	1.0	1.0	2.2
<b>3</b>	8.9	3.3	5.6	0.58	0.2	0.4	1.3	0.6	3.1
<b>4</b>	9.7	3.0	6.7	0.44	0.3	0.8	1.2	1.1	3.3
<b>5</b>	8.9	2.9	6.0	0.48	0.4	0.7	1.0	1.0	2.9
<b>6</b>	8.3	3.4	4.9	0.69	0.4	0.9	1.4	0.7	1.9
<b>7</b>	10.0	3.4	6.6	0.51	0.3	0.6	1.5	1.1	3.1
<b>8</b>	9.7	3.1	6.6	0.46	0.4	1.1	0.9	1.1	3.1
<b>9</b>	9.1	2.5	6.6	0.37	0.4	0.6	1.1	1.2	3.3
<b>10</b>	10.5	3.3	7.2	0.45	0.3	0.6	1.9	0.7	3.7
<b>11</b>	7.6	2.8	4.8	0.58	0.3	0.7	0.9	0.8	2.1
<b>12</b>	8.2	2.6	4.6	0.56	0.5	0.7	0.5	0.6	2.3
<b>13</b>	9.0	2.6	6.4	0.40	0.6	0.8	0.8	1.0	3.2
<b>14</b>	9.5	3.1	6.4	0.48	0.5	0.9	1.0	1.2	2.8
<b>15</b>	10.2	3.8	6.4	0.59	0.3	1.1	2.1	0.7	2.2
<b>16</b>	8.9	3.1	5.8	0.53	0.4	0.7	1.6	0.5	2.6
<b>17</b>	9.1	2.9	6.2	0.46	0.2	0.7	1.1	1.4	2.8
<b>18</b>	10.2	2.6	6.6	0.39	0.3	1.3	0.4	1.6	3.0
<b>19</b>	8.5	2.5	6.0	0.41	0.4	0.8	1.5	1.4	1.9
<b>20</b>	8.5	1.8	6.7	0.26	0.3	0.6	1.1	2.9	1.8
<b>Media</b>	<b>9.082353</b>	<b>2.976471</b>	<b>6.041176</b>	<b>0.497059</b>	<b>0.323529</b>	<b>0.752941</b>	<b>1.235294</b>	<b>1.1</b>	<b>3.658824</b>
<b>DS</b>	<b>0.847227</b>	<b>0.475039</b>	<b>0.745871</b>	<b>0.109987</b>	<b>0.066421</b>	<b>0.229449</b>	<b>0.406111</b>	<b>0.554527</b>	<b>0.992815</b>

$p < 0.01$

Tabella 4. Gruppo B: quadro proteico elettroforetico.

<b>Cane</b>	<b>PT</b>	<b>Albumine</b>	<b>Globuline</b>	<b>A/G</b>	<b>Alfa<sub>1</sub></b>	<b>Alfa<sub>2</sub></b>	<b>Beta<sub>1</sub></b>	<b>Beta<sub>1</sub></b>	<b>Gamma</b>
<b>1</b>	6.0	2.7	3.3	0.81	0.3	0.6	0.4	0.5	1.5
<b>2</b>	6.8	2.9	3.9	0.74	0.3	0.6	0.8	0.4	1.2
<b>3</b>	7.4	3.3	4.0	0.82	0.2	0.4	1.1	0.7	1.6
<b>4</b>	6.2	3.0	3.2	0.93	0.3	0.8	0.3	0.6	1.2
<b>5</b>	6.7	3.2	3.5	0.91	0.0	0.7	0.5	0.5	1.8
<b>6</b>	6.7	3.4	3.3	1.03	0.4	0.9	0.4	0.3	1.3
<b>7</b>	6.4	2.9	3.5	0.82	0.3	0.6	0.5	0.6	1.5
<b>8</b>	7.6	2.8	4.8	0.58	0.4	1.1	0.8	0.5	2.0
<b>9</b>	6.0	3.0	3.0	1.0	0.4	0.6	0.5	0.3	1.2
<b>10</b>	6.5	3.2	3.3	0.96	0.3	0.6	0.7	0.3	1.4
<b>11</b>	6.5	3.1	3.4	0.91	0.3	0.7	0.2	0.8	1.4
<b>12</b>	6.2	3.4	2.8	1.2	0.1	0.2	0.5	0.4	1.6
<b>13</b>	6.0	2.6	3.4	0.76	0.2	0.7	0.7	0.4	1.4
<b>14</b>	6.3	2.8	3.5	0.8	0.2	1.0	0.6	0.5	1.2
<b>15</b>	6.0	2.7	3.3	0.81	0.3	1.1	0.4	0.3	1.2
<b>16</b>	6.1	2.6	3.5	0.74	0.4	0.7	0.5	0.5	1.3
<b>17</b>	6.4	2.8	3.6	0.77	0.2	0.7	0.7	0.6	1.4
<b>18</b>	6.1	2.4	3.7	0.64	0.3	1.3	0.2	0.6	1.3
<b>19</b>	6.2	2.6	3.6	0.72	0.4	0.8	0.6	0.4	1.4
<b>20</b>	5.6	2.8	2.8	1.0	0.3	0.6	0.2	0.6	1.1
<b>21</b>	6.4	3.0	3.4	0.88	0.4	0.9	0.6	0.3	1.2
<b>22</b>	5.6	2.4	3.2	0.75	0.2	0.8	0.3	0.5	1.4
<b>23</b>	5.5	2.5	3.0	0.83	0.3	0.9	0.3	0.4	1.1
<b>24</b>	5.0	2.4	2.6	0.92	0.1	0.2	0.4	0.6	1.3
<b>Media</b>	<b>6.2583</b>	<b>2.854167</b>	<b>4.6</b>	<b>0.847083</b>	<b>0.275</b>	<b>0.729167</b>	<b>0.504167</b>	<b>0.475</b>	<b>1.375</b>
<b>DS</b>	<b>0.542137</b>	<b>0.306423</b>	<b>5.853056</b>	<b>0.135405</b>	<b>0.107339</b>	<b>0.259563</b>	<b>0.223566</b>	<b>0.122474</b>	<b>0.215184</b>

$p < 0.01$

I risultati riportati nelle tabelle 3 e 4, rivelano un anomalo incremento dei valori beta e gamma-globuline in entrambi i gruppi osservati. I cani del gruppo A (trombocitopenici) mostrano una concentrazione superiore di beta [media: 1.235294 g/dl (DS: 0.406111) ( $\beta_1$ ) e 1.1 g/dl (DS: 0.554527) ( $\beta_2$ )] e gamma-globuline [media: 3.658824 g/dl (DS: 0.992815)] maggiore, statisticamente significativa, rispetto agli animali del gruppo B (non trombocitopenici) [beta-globuline, media: 0.504167 g/dl (DS: 0.223566) ( $\beta_1$ ) e 0.475 g/dl (DS: 0.122474) ( $\beta_2$ ); gamma-globuline, media: 1.375 g/dl (DS: 0.215184)].

Allo stesso modo, si è riscontrato un rapporto A/G chiaramente invertito nei soggetti del gruppo A [media: 0.497059 (DS: 0.109987)], rispetto a quelli del gruppo B [media: 0.847083 (DS: 0.135405)], prossimi alla norma.

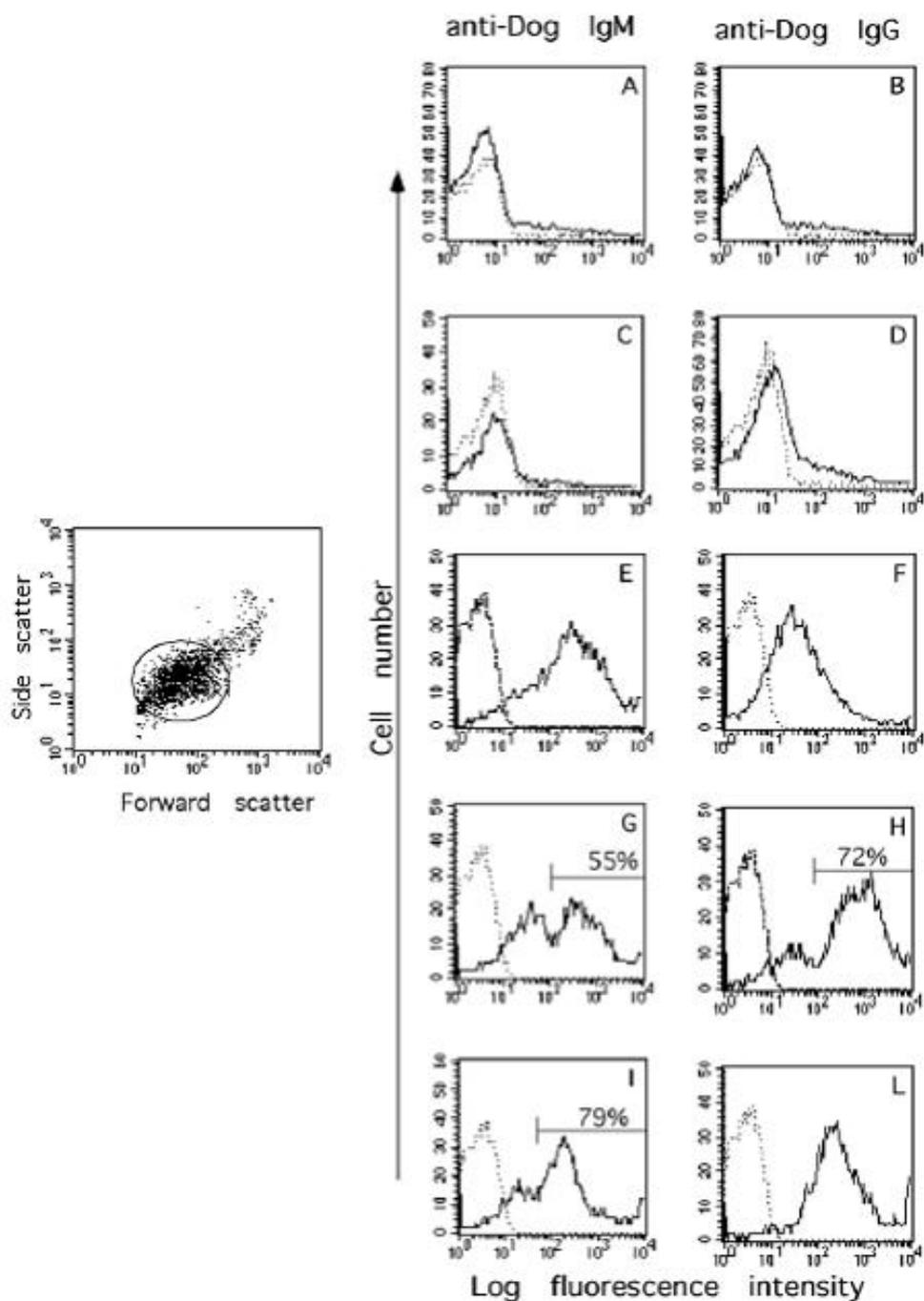


Figura 1. Citometria a flusso: risultati.

La figura 1, mostra il risultato dell'incubazione delle piastrine ottenute dai soggetti sani trattate con IgM o IgG anti-cane e marcate con FITC dopo essere state incubate con il siero dei cani sani o dei soggetti infetti (riquadro piccolo, a sinistra).

Sono stati ottenuti tre profili tipici dagli animali infetti (riquadro grande, a destra): un singolo picco sia per PBIgM che PBIgG (pannello E ed F); un doppio picco sia per PBIgM che PBIgG (pannello G ed H); un doppio picco per PBIgM e singolo per PBIgG (pannello I ed L).

La tabella 5 dei risultati, mostra il numero dei cani infetti del gruppo A e del gruppo B che possedevano PBIgM e/o PBIgG. Nello specifico, si desume che 32 dei 44 cani infetti (72.7%) avevano PBIg; 19 dei 20 cani del gruppo A e 13 dei 24 cani del gruppo B avevano PBIgM o PBIgM e PBIgG.

Si osservava una significativa associazione tra l'occorrenza di trombocitopenia e la presenza sia di PBIgM ( $p < 0.01$ ) e PBIgG ( $p < 0.01$ ). L'analisi dell'isotipo delle PBIg mostrava che tutti i cani avevano sia PBIgM che PBIgG, ad eccezione per 2 cani del gruppo A e 10 cani del gruppo B, che avevano solo PBIgM.

Il gruppo di controllo, infine, non mostrava titoli rilevabili di PBIgM e PBIgG.

Tabella 5. Citofluorimetria: riassunto risultati gruppo A e gruppo B.

<b>Gruppo</b>	<b>PBIgM e/o PBIgG</b>	<b>PBIgM e PBIgG</b>
<b>Gruppo A</b>	19/20 cani (95%)	18/20 cani (90%)
<b>Gruppo B</b>	13/24 cani (54.16%)	10/24 cani (41.66%)

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Come precedentemente riportato, la trombocitopenia immunomediata, è una tra le cause più comuni per quanto concerne i disordini emostatici del cane e può realizzarsi senza una specifica causa scatenante: in tal caso viene definita come *trombocitopenia immunomediata primaria* o *porpora trombocitopenica idiopatica*.

Più spesso, sono descritte forme secondarie a malattie autoimmuni, trattamenti farmacologici, trasfusioni di sangue o suoi derivati, neoplasie od infezioni di vario genere (Coller et al., 1989).

È noto, inoltre, che anticorpi in grado di legare le piastrine vengono prodotti, nel cane, anche in corso di malattie infettive quali filariosi cardiopolmonare, babesiosi, rickettiosi ed ehrlichiosi (Cockburn e Troy, 1986; Breitschwerdt, 1988; Grindem et al., 1999) e che, in corso di infezione leishmaniotica, si possa assistere ad una risposta immunitaria di tipo Th2 (Pinelli et al., 1999), con iperstimolazione dei

linfociti B, responsabile di disproteidemia riconoscibile in iperglobulinemia di tipo policlonale (Pinelli et al., 1994, 1999).

Le piastrine, alla luce di recenti studi, sono state riconosciute quale bersaglio di specifici anticorpi o sito di deposito di immunocomplessi, che potrebbero dare luogo ad una condizione trombocitopenica immunomediata (Corona et al., 2004; Pelagalli et al., 2004; Ciaramella et al., 2005). In particolare, anticorpi anti-piastrine sono stati osservati in pazienti leishmaniotici in rapporto al grado di compromissione clinica (Terrazzano et al., 2006).

Per una corretta diagnosi di trombocitopenia mediata da anticorpi nel cane è necessario avvalersi di specifiche e sensibili tecniche, finalizzate alla dimostrazione di anticorpi diretti verso la membrana e/o immunoprecipitati a livello della stessa. Tra queste, la CFM ha avuto un'ampia diffusione per migliorare l'accuratezza della diagnosi di tale diagnosi ed è, attualmente, considerata una delle più sensibili e specifiche metodiche di laboratorio per svelare la presenza di PBIg (Kohn et al., 1999; Chabanne et al., 2000; Davis et al., 2002). I vantaggi della CFM si riconoscono nella possibilità di quantificare gli anticorpi leganti una determinata linea cellulare, nella sensibilità tale da mettere in evidenza concentrazioni di anticorpi non riconoscibili mediante osservazione della fluorescenza dei preparati e nella capacità di poter passare al vaglio anche campioni di dimensioni ridotte (Kristensen, 1994).

I risultati del presente studio dimostrano la presenza di PBIgM e PBIgG nel siero di cani naturalmente infetti da *Leishmania infantum*, nonché la loro assenza nei soggetti sani, costituenti il gruppo di controllo.

Tali anticorpi portano a ritenere che siano espressione dell'esposizione di antigeni piastrinici, avvenuta nel corso della malattia.

L'esistenza del peculiare meccanismo denominato "aderenza immunitaria" (Domínguez e Toraño, 2001), sembra comparire nelle fasi iniziali dell'infezione, permettendo ai parassiti di interagire direttamente con le piastrine, con la formazione di ampi aggregati; si ritiene, inoltre, che, durante tale fase, lo stesso parassita possa modificare la membrana piastrinica, stimolando, così una specifica risposta immunitaria.

Nel nostro studio, è stata, inoltre, osservata una corrispondenza significativa tra i livelli sierici di tali anticorpi e la compromissione clinica. In particolare, va evidenziato, nei soggetti trombocitopenici, un'esaltata produzione di immunoglobuline, segnatamente frazioni beta e gamma, in misura maggiore, statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ), rispetto al gruppo degli animali non trombocitopenici. Tale rilievo trova corrispondenza nella maggior parte dei quadri clinici ed ematologici di maggiore severità.

I risultati ottenuti suggeriscono che le PBIg assumono un ruolo di prim'ordine nel determinismo della trombocitopenia immunomediata nei cani affetti da leishmaniosi. Tuttavia, la mancanza di PBIg in uno dei cani trombocitopenici induce ad ipotizzare una patogenesi più complessa della trombocitopenia: a tal proposito, è stata anche supposta una diminuita trombocitopoiesi od un sequestro splenico quale spiegazione dell'evento (Mackin, 1995).

Nell'uomo, i soggetti interessati da trombocitopenia immunomediata in corso di leishmaniosi, mostrano principalmente IgG (in circa il 65% dei casi), o IgG associate ad IgM (in circa il 30% dei casi) (Tijhuis et al., 1991).

Le PBIg nei cani leishmaniotici con turbe emostatiche sono, di frequente, riconoscibili in IgG (in circa il 55-80% dei casi) (Kristensen et al., 1994; Lewis e Meyers, 1996).

Nel presente lavoro, lo studio delle specifiche classi delle PBIg ha dimostrato come l'85% dei 20 cani trombocitopenici avessero sia PBIgM che PBIgG: tutto quanto potrebbe essere giustificato dalle continue reinfezioni cui tali animali sono soggetti nelle regioni endemiche. Va, inoltre, rilevato che l'elevata risposta dei linfociti B timo-indipendenti, evocata dal parassita, potrebbe giustificare una maggiore presenza delle PBIgM nei due gruppi di soggetti infetti (Schofield, 1991; Wabl e Steinberg, 1996).

Le PBIg sono in grado di determinare anche piastrinopatia, con conseguente alterata funzione emostatica (Mackin, 1995): anticorpi capaci di legare specifici recettori di membrana dei trombociti, evocandone una disfunzione, sono stati svelati sia negli uomini che nei cani affetti da trombocitopenia immunomediata.

Nello specifico, un'alterata capacità di aggregazione è stata riconosciuta a carico delle piastrine di cani naturalmente infetti da *Leishmania* (Balduini et al., 1987; Kristensen et al., 1994; Ciaramella et al., 2005).

Infatti, negli ultimi anni, ricerche aventi per oggetto lo studio dell'aggregazione piastrinica, attraverso l'impiego di ADP e collegane come agonisti, hanno

evidenziato, una significativa riduzione dell'aggregazione piastrinica, soprattutto in seguito all'impiego del collagene (Pelagalli et al., 2004; Ciaramella et al., 2005). La maggiore sensibilità di tale agonista può trovare motivo considerando le rispettive differenti affinità per i recettori di membrana. L'ADP, in qualità di agonista, interagisce con il recettore Gp IIb/IIIa, mentre il collagene si lega in special modo al recettore di membrana Gp Ia/IIa (Born, 1962; Collier et al., 1989): probabilmente, il parassita causa un danno diretto ai recettori della membrana piastrinica, che non possono essere riconosciuti come *self* e, di conseguenza, attivano il processo immunomediato. Nei pazienti umani con trombocitopenia, è stata messa in evidenza un'elevata affinità di legame tra il recettore piastrinico Gp IIb/IIIa e gli anticorpi PBIgG: alla luce di questi dati, dunque, è possibile ipotizzare che una più bassa quota di PBIgG provochi alterazioni minime del recettore Gp IIb/IIIa e, perciò, una migliore risposta all'ADP.

Nella presente tesi, il rilievo di una trombocitopenia immunomediata secondaria lascia ritenere che l'uso di sostanze immunosoppressive, ed in particolare l'impiego di cortisonici, possa trovare giustificazione nei soggetti affetti da tale malattia protozoaria. In un recente studio, Cortese e collaboratori (2008) hanno, infatti, dimostrato un miglioramento delle capacità aggreganti delle piastrine in soggetti naturalmente infetti, in seguito all'impiego di prednisolone a dosaggio medio di 0.5 - 1 mg/Kg. Studi attualmente in corso, e condotti mediante l'impiego di metodica citofluorimetrica, sembrano confermare tale tendenza.

In conclusione, lo studio della presente tesi mette in evidenza, per la prima volta, la presenza di anticorpi diretti verso le piastrine, facendo risaltare, ulteriormente, l'importanza dei meccanismi immunomediati nella patogenesi di tale malattia.

Futuri studi, vanno comunque eseguiti e finalizzati ad una migliore comprensione del quadro immunologico, attraverso lo studio di specifiche linee cellulari coinvolte nel meccanismo autoimmune responsabile, spesso, della maggiore severità e poliedricità del quadro clinico.



## BIBLIOGRAFIA

1. Loscalzo J., Schaffer A. I., “Thrombosis and haemorrhage”, 3<sup>rd</sup> edition. *Lippincott Williams & Wilkins*; 2003.
2. Zipes D. P., Libby P., Bonow R. O., Braunwald E., “Malattie del cuore. Trattato di Medicina cardiovascolare”, VII edizione. *Masson*; 2007.
3. Rosenberg R. D., Aird W. C., “Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states”. *New England Journal of Medicine*, 340:1555; 1999.
4. Shantsila E., Lip G. Y., ”Monocytes in acute coronary syndrome”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29 (10): 1433-8; 2009.

5. Pivkin I., Richardson P., Karniadakis G., “Effect of red blood cells on platelet aggregation”. *Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 28 (2): 32-7; 2009.
6. Kubo H., Alitalo K., “The bloody fate of endothelial stem cells”. *Genes & Development*, 17:322; 2003.
7. Carmeliet P., “Angiogenesis in health and disease”. *Nature Medicine*, 9:653; 2003.
8. Schafer A. I., “Vascular endothelium: in defense of blood fluidity”. *Journal of Clinical Investigation*, 99:1143; 1997.
9. Edelberg J. M., Christie P. D., Rosenberg R. D., “Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential”. *Circulation Research*, 89:117; 2001.
10. Cook J. P., “Flow, NO and atherogenesis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 100:1420; 2003.
11. Davidge S. T., “Prostaglandin H synthase and vascular function”. *Circulation Research*, 89:650; 2001.

12. Smyth E. M., Fitzgerald G. A., “Human prostacyclin receptor”. *Vitamins & Hormones*, 65:149; 2002.
13. Durante W., Schafer A.I., “Carbon monoxide and vascular cell function”. *International Journal of Molecular Medicine*, 2:255; 1998.
14. Busse R., Edward G., Feletou M., et al., “EDHF: bringing the concepts together”. *Trends in Pharmacological Science*, 23:374; 2002.
15. Marcus A. J., Broekman M. J., Drosopoulos J. H., et al., “Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ectonucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases”. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305:9; 2003.
16. Schiffrin E. L., “A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension”. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 38 (suppl 2): S3; 2001.
17. Busse R., Fleming I., “Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces”. *Trends in Pharmacological Science*, 24:24; 2003.

18. Sullivan P. S., Manning K. L., McDonald T. P., "Association of mean platelet volume and bone marrow megakaryocytopoiesis in thrombocytopenic dogs: 60 cases (1984-1993)". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 206, 332-334; 1995.
19. Grindem C. B., Breitschwerdt E. B., Corbett W. T., Jans H. E., "Epidemiological survey of thrombocytopenia in dogs: a report on 987 cases". *Veterinary Clinical Pathology*, 20, 38-43; 1991.
20. Couto C. G., "Disseminated intravascular coagulation in dogs and cats". *Veterinary Medicine*, 94, 547-553; 1999.
21. Schmaier A. H., "Contact activation: a revision". *Thrombosis and Haemostasis*, 78:101; 1997.
22. Jain N. C., "Essential of Veterinary Hematology". *Philadelphia: Lea & Febiger*, 105-133; 1993.
23. Mathew M., Goel G., "Rosettes in idiopathic thrombocytopenic purpura: an unusual observation". *The Internet Journal of Hematology*, 6, 1; 2009.

24. Fulwyler M. J., "Status quo in flow-through cytometry". *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 22 (7): 605-606; 1974.
25. Martínez-Osorio H., Calonge M., Corell A., Reinoso R., Lòpez A., Fernàndez I., San José E. G., Diebold Y., "Characterization and short-term culture of cells recovered from human conjunctival epithelium by minimally invasive means". *Molecular Vision*, 27, 15: 2185-2195; 2009.
26. De Santis D., Foley B. A., John E., Senitzer D., Christiansen F. T., Witt C. S., "Rapid, flow cytometric assay for NK alloreactivity reveals exceptions to rules governing alloreactivity". *Biology of Blood and Bone Marrow Transplantation*, October; 2009.
27. Van Dilla M.A., Dean P.N., Laerum O.D., Melamed M.R., "Flow cytometry: instrumentation and data analysis". *Academic Press*, London; 1985.
28. Kametsky L. A., Myron R. Melamed M. R., Derman H., "Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis". *Science*, 150, 3696: 630-631; 1965.
29. Valtriani C., Hurle C., "Citofluorimetria a flusso". *Caleidoscopio Italiano*, II; 1997.

30. Spiel A. O., Kliegel A., Janata A., Uray T., Mayr F. B., Laggner A. N., Jilma B., Sterz F., "Hemostasis in cardiac arrest patients treated with mild hypothermia initiated by cold fluids". *Resuscitation*, 80 (7): 762-765; 2009.
31. Kaushansky K., "Thrombopoietin". *New England Journal of Medicine*, 339:746; 1998.
32. Jandl J. H., "Blood: textbook of hematology". 2<sup>nd</sup> ed. *Boston: Little, Brown and Company*, 1301-1360; 1996.
33. Slichter S. J., Deeg H. J., Kennedy M. S., "Prevention of platelet alloimmunization in dogs with systemic cyclosporine and by UV-irradiation or cyclosporine-loading of donor platelets". *Blood*, 69, 414-418, 1987.
34. Feldman B. F., Zinkl J. G., Jain N. C., "Veterinary hematology", fifth edition. *Lippincott Williams & Wilkins*; 2000.
35. Nichol J.L., Hornkolh M. M., Choi E. S., Hokom M. M., Ponting I., Schuening F. W., Hunt P., "Enrichment and characterization of peripheral blood-derived megakaryocyte progenitors that mature in short-term liquid culture". *Stem Cells*, 12:494-505; 1994.

36. Schipper L. F., Brand A., Reniers N. C., Melief C. J., Willemze R., Fibbe W. E., "Effects of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of primitive and mature haemopoietic progenitor cells in cord blood". *British Journal of Haematology*, 101:425-435; 1998.
37. Debili N., Masse J. M., Katz A., Guichard J., Breton-Gorius J., Vainchenker W., "Effects of the recombinant hematopoietic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34<sup>+</sup> cells". *Blood*, 82:84-95; 1993.
38. Ku H., Yonemura Y., Kaushansky K., Ogawa M., "Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice". *Blood*, 87:4544-4551; 1996.
39. Metcalf D., MacDonald H. R., Odartchenko N., Sordat B., "Growth of mouse megakaryocyte in colonies *in vitro*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 72:1744-1748; 1975.

40. Levin J., Levin F. C., Penington D. G., Metcalf D., "Measurement of ploidy distribution in megakaryocyte colonies obtained from culture: with studies of the effects of thrombocytopenia". *Blood*, 57:287-297; 1981.
41. Ebbe S., Yee T., Carpenter D., Phalen E., "Megakaryocytes increase in size within ploidy groups in response to the stimulus of thrombocytopenia". *Experimental Hematology*, 16:55-61; 1988.
42. Ebbe S. Stohlman F. Jr., "Megakaryocytopoiesis in the rat". *Blood*, 26:20-35; 1965.
43. Lichtman M. A., Chamberlain J. K., Simon W., Santillo P. A., "Parasinusoidal location of megakaryocytes in marrow: a determinant of platelet release". *American Journal of Hematology*, 4:303-312; 1978.
44. MacPherson G. G., "Origin and development of the demarcation system in megakaryocytes of rat bone marrow". *Journal of Ultrastructural Research*, 40:167-177; 1972.
45. Bentfeld-Barker M. E., Bainton D. F., "Ultrastructure of rat megakaryocytes after prolonged thrombocytopenia". *Journal of Ultrastructural Research*, 61:201-214; 1977.

46. Zucker-Franklin D., Peterssen S., "Thrombocytopoiesis-analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes". *Journal of Cellular Biology*, 99:390-402; 1984.
47. Menard M., Meyers K. M., Prieur D. J., "Primary and secondary lysosomes in megakaryocytes and platelets from cattle with Chediak-Higashi syndrome". *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 64:156-160; 1990.
48. Heijnen H. F., Debili N., Vainchencker W., Breton-Gorius J., Geuze H. J., Sixma J. J., "Multivesicular bodies are an intermediate stage in formation of platelet alpha-granules". *Blood*, 91:2313-2325; 1998.
49. Menard M., Meyers K. M., "Storage pool deficiency in cattle with the Chediak-Higashi syndrome results from an absence of dense granule precursors in their megakaryocytes". *Blood*, 72:1726-1734; 1988.
50. van Pampus E. C., Denkers I. A., van Geel B. J., Huijgens P. C., Zevenbergen A., Ossenkoppele G. J., Langenhuijsen M. M., "Expression of adhesion antigens of human bone marrow megakaryocytes, circulating megakaryocytes and blood platelets". *European Journal of Haematology*, 49:122-127; 1992.

51. Topp K. S., Tablin F., "Bovine megakaryocytes integrins: their association with extracellular matrix *in vivo*". *Comparative Haematology International*, 1:135-144; 1991.
52. Radley J. M., Haler C. J., "The demarcation membrane system of the megakaryocytes: a misnomer?". *Blood*, 60:213-219; 1982.
53. Tablin F., Castro M., Leven R. M., "Blood platelet formation *in vitro*. The role of the cytoskeleton in megakaryocytes fragmentation". *Journal of Cellular Science*, 97:59-70; 1990.
54. Choi E. S., Nichol J. L., Hokom M. M., Hornkohl A. C., Hunt P., "Platelets generated *in vitro* from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional". *Blood*, 85:402-413; 1995.
55. Di Bella L., Rossi M. T., Pellegrino N., Grimaldi A., Santoro V., "Ruolo del sistema abenulo-epifisario nella regolazione del tasso piastrinamico". *Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, vol. XLV, 20bis; 1969.
56. Ebbe S., Phalen E., Stohlman F. Jr., "Abnormalities of megakaryocytes in Sl-Sld mice". *Blood*, 42:857-871; 1973.

57. Choi E., "Regulation of proplatelet and platelet formation *in vitro*". *Thrombopoiesis and thrombopoietins: humana press*, 271-284; 1997.
58. Zwaal R. F. A., Schroit A. J., "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells". *Blood*, 89:1121-1132; 1997.
59. Gentry P. A., "The mammalian blood platelets: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair". *Journal of Comparative Pathology*, 107:243-270; 1992.
60. Colman R. W., Hirsh J., Marder V. J., Salzman E. W., "Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice", 3<sup>rd</sup> edition. *Philadelphia: J. B. Lippincott Company*, 603; 1994.
61. Longenecker G. L., "The platelets: physiology and pharmacology". *New York: Academic Press*, 289; 1985.
62. Maclouf J., Folco G., Patrono C., "Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease". *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 79:691-705; 1998.

63. van Hinsbergh V. W. M., "Vascular control of hemostasis". *Amsterdam: Harwood Academic Publishers*, 127; 1996.
64. Connors J. M., Britton K. A., "Interactive medical case. A bloody mystery". *New England Journal of Medicine*, 15, 361 (16): e33; 2009.
65. Stickney D. R., Dowding C., Garsd A., Ahlem C., Whitnall M., McKeon M., Reading C., Frincke J., "5-androstenediol stimulates multilineage hematopoiesis in rhesus monkeys with radiation-induced myelosuppression". *International Immunopharmacology*, 6 (11): 1706-1713; 2006.
66. Averbeck M., Gebhardt C., Emmrich F., Treudler R., Simon J. C., "Immunologic principles of allergic disease". *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 5 (11): 1015-1028; 2007.
67. Fukaya S., Yasuda S., Hashimoto T., Oku K., Kataoka H., Horita T., Atsumi T., Koike T., "Clinical features of haemophagocytic syndrome in patient with systemic autoimmune disease: analysis of 30 cases". *Rheumatology (Oxford)*, 47 (11): 1686-1691; 2008.
68. Treon S. P., "How I treat Waldenström macroglobulinemia". *Blood*, 114 (12): 2375-2385; 2009.

69. Rafaj R. B., Matijatko V., Kis I., Zivicnjak T., Lemo N., Zvorc Z., Brkljacic M., Mrljak V., "Alterations in some blood coagulation parameters in naturally occurring cases of canine babesiosis". *Acta Veterinaria Hungarica*, 57 (2): 295-304; 2009.
70. Javela K., Kekomäki R., Koskinen S., "Significance of quantitative measurement of heparin-induced platelet antibodies". *European Journal of Haematology*, October; 2009.
71. Haymore B. R., Mikita C. P. Tsokos G. C., "Common variable immune deficiency (CVID) presenting disease: role of memory B cells". *Autoimmunity Reviews*, 7 (4): 309-321; 2008.
72. Rodeghiero F., Besalduch J., Michel M., Provan D., Grotzinger K., Thompson G., "Treatment practices in adults with chronic immune thrombocytopenia - A European perspective". *European Journal of Haematology*, October; 2009.
73. Spanoudakis E., Tsatalas C., "Hemopoiesis in Ph-negative chronic myeloproliferative disorders". *Current Stem Cell Research & Therapy*, 4 (2): 154-160; 2009.

74. Pecci A., Malara A., Badalucco S., Bozzi V., Torti M., Balduini A.,  
“Megakaryocytes of patients with MYH9-related thrombocytopenia present an  
altered proplatelet formation”. *Thrombosis and Haemostasis*, 102 (1): 90-96;  
2009.
75. Trounson A., “New perspectives in human stem cell therapeutic research”.  
*BMC Medicine*, 11, 7:29; 2009.
76. Gewirtz A. M., Keefer Sacchetti M., Bien R., Barry W. E., “Cell-mediated  
suppression of megakaryocytopoiesis in acquired amegakaryocytic  
thrombocytopenic purpura”. *Blood*, 68: 619-626; 1986.
77. Hoffman R., Briddell R. A., van Besien K., Srour E. F., Guscar T., Hudson N.  
W., Ganser A., ”Acquired cyclic amegakaryocytic thrombocytopenia  
associated with an immunoglobulin blocking the action of granulocyte-  
macrophage colony-stimulating factor”. *New England Journal of Medicine*,  
321: 97-102; 1989.
78. Dixon F. J., Humprey J. H., “Advances in Immunology”. *New York: Academic  
Press*, 3: 131-180; 1963.

79. Kunicki T. J., George J. N., "Platelet immunobiology: molecular and clinical aspects". *Philadelphia: J. B. Lippincott*, 305-336; 1989.
80. Karpatkin S., Xia J., Patel J., Thorbecke G. J., "Serum platelet-reactive IgG of autoimmune thrombocytopenic purpura patients is not F(ab')<sub>2</sub> mediated and a function of storage". *Blood*, 80: 3164-3172; 1992.
81. Ruggeri Z. M., "Structure of von Willenbrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation". *Baillieres Best Practice in Clinical Haematology*, 14:257; 2001.
82. de Wit T. R., van Mourik J. A., "Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implication". *Baillieres Best Practice in Clinical Haematology*, 14:241; 2001.
83. Andrews R. K., Shen Y., Gardiner E. E., et al., "The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signalling". *Thrombosis and Haemostasis*, 82:357; 1999.
84. McEver R. P., "Adhesive interaction of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation". *Thrombosis and Haemostasis*, 86:746; 2001.

85. Andre P., Denis C. V., Ware J., et al., "Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins". *Blood*, 96:3322; 2000.
86. Savage B., Almus-Jacobs F., Ruggeri Z. M., "Specific synergy of multiple substrate receptor interactions in platelet thrombus formation under flow". *Cell*, 94:657; 1998.
87. Nakamura T., Kambayashi J., Okuma M., "Activation of the Gp IIb/IIIa complex induced by platelet adhesion to collagen is mediated by both  $\alpha_2$ - $\beta_1$  integrin and Gp VI". *Journal of Biological Chemistry*, 274:11897; 1999.
88. Nieswandt B., Watson S. P., "Platelet-collagen interactions: is Gp VI the central receptor?". *Blood*, 102:449; 2003.
89. Ruggeri Z. M., "Platelets in atherothrombosis". *Nature Medicine*, 8:1227; 2002.
90. Thomas D. W., Mannon R. B., Mannon P. J., et al.: "Coagulation defects and altered hemodynamic response in mice lacking receptors for thromboxane  $A_2$ ". *Journal of Clinical Investigation*, 102:1994; 1998.

91. Jackson S. P., Nesbitt W. S., Kulkarni S., "Signaling events underlying thrombus formation". *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1:1602; 2003.
92. Bennett J. S., "Platelet-fibrinogen interactions". *The Annals of the New York Academy of Sciences*, 936: 340; 2001.
93. Schafer A. I., "Antiplatelet therapy with glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors and other novel agents". *Texas Heart Institute Journal*, 24:90; 1997.
94. Griffin J. H., "The thrombin paradox". *Nature*, 378:337; 1995.
95. Hanson S. R., Griffin J. H., Harker L. A., et al., "Antithrombotic effects of thrombin induced activation of endogenous protein C in primates". *Journal of Clinical Investigation*, 92:2003; 1993.
96. Mann K. G., Butenas S., Brummel K., "The dynamics of thrombin formation". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23:17; 2003.
97. Esmon C. T., "Inflammation and thrombosis". *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1:1343; 2003.

98. Gowing G. M., "Idiopathic thrombocytopenic purpura in the dog". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 145: 987-990; 1964.
99. Magrane H. J. Jr, Magrane W. G., Ross J. R., "Idiopathic thrombocytopenic purpura in a dog: a case report". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 520-522; 1959.
100. Wilkins R. J., Hurvitz A., Dodds-Laffin J., "Immunologically mediated thrombocytopenia in the dog". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 163: 277-282; 1973.
101. Lewis D. C., Meyers K. M., Callan M. B., Bücheler J., Giger U., "Detection of platelet-bound and serum platelet-bindable antibodies for diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura in dogs". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 206: 47-52; 1995.
102. Scott M. A., "Canine immune-mediated thrombocytopenia: assay development, a role for complement, and assessment in a toxicologic study". *Michigan State University, PhD*, 451; 1995.
103. Beutler E., Lichtman M. A., Coller B. S., Kipps T. J., eds, "Williams hematology". 5<sup>th</sup> ed. *New York: McGraw-Hill*, 1315-1355; 1995.

104. Jackson M. L., Kruth S. A., "Immune-mediated hemolytic anemia and thrombocytopenia in the dog: a retrospective study of 55 cases diagnosed from 1969 through 1983 at the Western College of Veterinary Medicine". *Canadian Veterinary Journal*, 26: 245-250; 1985.
105. Jain N. C., Switzer J. W., "Autoimmune thrombocytopenia in dogs and cats". *Veterinary Clinic of North America Small Animal Practice*, 421-433; 1981.
106. Williams D. A., Maggio-Price L., "Canine idiopathic thrombocytopenia: clinical observations and long-term follow-up in 54 cases". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185: 660-663; 1984.
107. Jain N. C., ed., "Schalm's veterinary hematology". 4<sup>th</sup> ed., *Philadelphia: Lea & Febiger*, 990-1039; 1986.
108. Joshi B. C., Jain N. C., "Detection of antiplatelet antibody in serum and on megakaryocytes of dogs with autoimmune thrombocytopenia". *American Journal of Veterinary Research*, 37: 681-685; 1976.

109. Halliwell R. E. W., "Autoimmune disease in domestic animals". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181: 1088-1096; 1982.
110. Lewis D. C., Meyers K. M., "Studies of platelet-bound and serum platelet-bindable immunoglobulins in dogs with idiopathic thrombocytopenic purpura". *Experimental Hematology*, 24, 696-701; 1996.
111. Mackin A., "Canine immune-mediated thrombocytopenia" part I and part II. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 17; 1995.
112. Scott. M. A., Kaiser L., Davis J. M., Scwartz K. A., "Development of a sensitive immunoradiometric assay for detection of platelet surface-associated immunoglobulins in n thrombocytopenic dogs". *American Journal of Veterinary Research*, 63 (1): 124-129; 2002.
113. Ciaramella P., Pelagalli A., Cortese L., Pero M. E., Corona M., Lombardi P., Avallone L., Persechino A., "Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*". *Veterinary Journal*, 169 (3): 465-467; 2005.

114. Koutinas A., Polizopoulou Z. S., Saridomichelakis M. N., Argyriadis D., Fytianou A., Plevraki K. G., “Clinical consideration on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996)”. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35: 376-383; 1999.
115. Koutinas A., Saridomichelakis M. N., “Clinical aspects of canine leishmaniasis in Greece”. *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis - Naples, Italy*, 45-50; 2004.
116. Petadines T. A., Koutinas A. F., Mylonakis M. E., Day M. J., Saridomichelakis M. N., Leontides L. S. et al., “Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*)”. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22: 866-872; 2008.
117. Ciaramella P., Corona M., “Canine leishmaniasis: part I and part II”. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 25; 2003.
118. Cockburn C., Troy G. C., “A retrospective study of 62 cases of thrombocytopenia in the dog”. *Southwest Veterinarian*, 37: 133-141; 1986.

119. Breitschwerdt E. B., “Infectious thrombocytopenia in dogs”. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 10: 1177-1191; 1988.
120. Chabanne L., Bonnefont C., Bernaudi J., Rigald D., “Clinical applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to companion animals (dog and cat)”. *Method in Cell Science*, 22: 199-207; 2000.
121. Kohn B., Engelbrecht R., Giger U., Leibold W., “Platelet-bound antibodies detected by a flow cytometric assay in dogs with thrombocytopenia”. *Proceeding of the 9<sup>th</sup> Annual Congress of the European Society of Internal Medicine, Perugia*, 159; 1999.
122. Davis E. G., Wilkerson M. J., Rush B. R., “Flow cytometry: clinical application in equine medicine”. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16: 404-410; 2002.
123. Putsche J. C., Kohn B., “Primary immune-mediated thrombocytopenia in 30 dogs (1997-2003)”. *Jornal of the American Animal Hospital Association*, 44 (5): 250-257; 2008.

124. Born G. V. R., "The aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal". *Nature*, 194: 927-929; 1962.
125. Collier B. S., Beer J. H., Scudder L. E., Steinberg M. H., "Collagen-platelet interactions: evidence for a direct interaction of collagen with platelet Gp Ia/IIa and an indirect interaction with platelet Gp IIb/IIIa mediated by adhesive proteins". *Blood*, 74: 182-192; 1989.
126. Lopez R., Lucena R., Novales M., Ginel P. J., Martin E., Molleda J. M., "Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis". *Journal of Veterinary Medicine B*, 43: 469-474; 1996.
127. Pelagalli A., Ciaramella P., Lombardi P., Pero M. E., Cortese L., Corona M., Oliva G., Avallone L., "Evaluation of Adenosine 5'-diphosphate (ADP) and collagen-induced platelet aggregation in canine leishmaniasis". *Journal of Comparative Pathology*, 130: 124-129; 2004.
128. Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenar J., Bernardina W., Del Real G., Ruitenbergh J., "Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*". *Infection & Immunity*, 62: 229-235; 1994.

129. Pinelli E., Rutten V. P., Ruitenberg E. J., "Cellular immune responses in canine leishmaniasis". *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum in Barcellona, Spain*; 1999.
130. Foglia Manzillo V., Restucci B., Pagano A., Gradoni L., Oliva G., "Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniasis". *Veterinary Record*, 158 (20): 690-694; 2006.
131. Dircks B. H., Schuberth H. J., Mischke R., "Underlying diseases and clinicopathologic variables of thrombocytopenic dogs with and without platelet-bound antibodies detected by use of a flow cytometric assay: 83 cases (2004-2006)". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235 (8): 960-966; 2009.
132. George J. N., "Definition, diagnosis and treatment of immune thrombocytopenic purpura". *Haematologica*, 94 (6): 759-762; 2009.
133. Vargo C. L., Taylor S. M., Haines D. M., "Immune mediated neutropenia and thrombocytopenia in 3 Giant Schnauzers". *Canadian Veterinary Journal*, 48 (11): 1159-1163; 2007.

134. Day M. J., Mackin A., Littlewood J. D., “Ematologia e medicina trasfusional del cane e del gatto”. *UTET*; 2000.
135. Lee G. R., Bitchell T. C., Foerster J., Athens J. W., Lukens J. N., eds, “Wintrobe’s clinical hematology”. 9<sup>th</sup> ed., *Philadelphia: Lea & Febiger*, 1356-1362; 1993.
136. de Andrade R.A., Barbosa Reis A., Ferreira Gontijo C.M., Bento Braga L., Rodrigues Rocha R.D., Silva Araújo M.S., Rocha Vianna L., Martins-Filho O.A., “Clinical value of anti-Leishmania (*Leishmania*) chagasi IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs”. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116, 85-97; 2007.
137. Silva O.A., Silva P.B., Silva O.V., Braga G.M., Albuquerque Júnior A., Queiros Neto V., Rocha M.E., Silva E.F., “Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: epidemiological aspects”. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 100 (1): 49-50; 2007.
138. Pangrazio K.K., Costa E.A., Amarilla S.P., Cino A.G., Silva T.M., Paixão T.A., Costa L.F., Dengues E.G., Diaz A.A., Santos R.L., “Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected

- fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches”.  
*Veterinary Parasitology*, 12, 165 (3-4): 327-331; 2009.
139. Travi B. L., Tabares C. J., Cadena H., Ferro C., Osorio Y., “Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sandflies”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64 (3,4): 119-124; 2001.
140. Binhazim A. A., Chapman W. L., Latimer K. S., Styles M., Comer K., “Canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in two Labrador retrievers”. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4: 299-305; 1992.
141. Bonfanti U., Zatelli A., “Evaluation of proteinuria in leishmaniotic patient”. *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis - Naples, Italy*, 13-17; 2004.
142. Brandonisio O., Panunzio M., Faliero S. M., Ceci L., Fasanella A., Puccini V., “Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum* infected dogs”. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 53: 95-103; 1996.

143. Brittingham A., Chen G., McGwire B. S., Chang K. P., Mosser D. M., “Interaction of *Leishmania* gp 63 with cellular receptors for fibronectin”. *Infection and Immunity*, 67, 9: 4477-4484; 1999.
144. Ciaramella P., Oliva G., De Luna R., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A., Persechino A., “A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*”. *Veterinary Record*, 141: 539-543; 1997.
145. Ciaramella P., Papparella S., Oliva G., “Panoftalmite granulomatosa bilaterale in corso di leishmaniosi del cane”. *Acta Medica Veterinaria*, 40: 313; 1994.
146. Ciaramella P., Pelagalli A., Cortese L., Pero M. E., Corona M., Lombardi P., Avallone L., “Platelet aggregation response in canine leishmaniasis”. *Platelets*, 13, 331; 2002.
147. Ciaramella P., Pelagalli A., Cortese L., Pero M. E., Corona M.m Lombardi P., Avallone L., Persechino A., “Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*”. *Veterinary Journal*, 169: 465-467; 2005.

148. Day M. J., “Implications of the immune system during infection by *Leishmania* organism in canine”. *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis - Naples, Italy*, 21-28; 2004.
149. De Luna R., Oliva G., Ciaramella P., Ambrosio R., Piantedosi D., “Valutazione dei fenomeni autoimmuni in corso di leishmaniosi nel cane”. *Acta Medica Veterinaria*, 41, 4; 1995.
150. Dominguez M., Toraño A., “*Leishmania* immune adherence reaction in *vetebrales*”. *Parasite Immunology*, 23: 259-265; 2001.
151. Ferrer L., “Simultaneous presentation of leishmaniasis and other infectious disease: clinical approach and mechanism”. *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis - Naples, Italy*, 37-38; 2004.
152. Ferrer L., Juanola B., Ramos J. A., Ramis A., “Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs”. *Veterinary Pathology*, 28: 342-343; 1991.
153. Font A., Closa J. M., Molina A., Mascort J., “Thrombosis and nephrotic syndrome in a dog with visceral leishmaniasis”. *Journal of Small Animal Parctice*, 34: 466-470; 1993.

154. Font A., Gines C., Closa J. M., Mascort J., "Visceral leishmaniasis and disseminated intravascular coagulation in a dog". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204, 7: 1043-1044; 1994.
155. Gimbo A., Scirpo A., Niutta P. P., Cristarella S., Caramazza C. D., "Prime osservazioni sulla presenza di *Leishmania* in utero post abortivo di cagna". *Atti della Società Italiana di Scienze Veterinarie*, vol. XLVIII, Annual Congress: 473; 1994.
156. Gradoni L., "Leishmaniosi canina". *Società Culturale Italiana Veterinaria Animali da Compagnia (SCIVAC)*, Cremona: 11; 1989.
157. Kyrle P. A., Stockenhuber F., Brenner B., "Evidence for an increased generation of prostacyclin in the microvasculature and an impairment of the platelet alpha granule release in chronic renal failure". *Thrombosis and Haemostasis*, 60: 205-208; 1988.
158. Margarito J. M., Lucena R., Lopez R., Molleda J. M., Martin E., Ginel P. J., "Levels of IgM and IgA circulating immune complexes in dogs with leishmaniasis". *Journal of Veterinary Medicine B*, 45: 263-267; 1998.

159. Maroli M., *Istituto Superiore di Sanità*: comunicazione personale; 2005.
160. Moreno P., “Evaluation of secondary haemostasis in canine leishmaniasis”. *Veterinary Record*, 144: 169-171; 1999.
161. Oliva G., “Clinical aspects of canine leishmaniasis in Italy”. *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis - Naples, Italy*, 63-65; 2004.
162. Pampiglione S., Canestri Trotti C., “Guida allo studio della Parassitologia, II edizione”. *Esculapio Editore*, 38-44; 1990.
163. Santos-Gomes G. M., Campino L., Abranches P., “Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes”. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95 (2): 193-198; 2000.
164. Severino L., De Luna R., Ferrante M. C., Ambrosio R., Piantedosi D., Bernadina W. E., “Valutazione della fluidità di membrana in eritrociti di cani affetti da leishmaniosi”. *Atti SISVet*, v. LI; 1997.

165. Slappendel R. J., "Dog with leishmaniasis". *Tijdschr Diergeneeskd*, 127 (11): 360-361; 2002.
166. Terrazzano G., Cortese L., Piantedosi D., Zappacosta S., Di Loria A., Santoro D., Ruggiero G., Ciaramella P., "Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*". *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110: 331-337; 2006.
167. Valladares J. E., Gopegui R. R., Riera C., Alberola J., Gallego M., Portus M., Arboix M., "Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs". *Research in Veterinary Science*, 64: 195-198; 1998.
168. Kristensen A. T., Weiss D. J., Klausner J. S., Laber J., Christie D. J., "Comparison of microscopic and flow cytometry detection of antiplatelet antibodies in dogs suspected of having immune-mediated thrombocytopenia". *American Journal of Veterinary Research*, 55, 1111-1114; 1994.
169. Tjihuis G. J., Klaasen R. J. L., Modderman P. W., Ouwehand W. H., Von Dem Borne A. E. G., "Quantification of platelet-bound immunoglobulins of different class and subclasses using radiolabelled monoclonal antibodies:

170. Schofield L., "On the function of repetitive domains in protein antigens of Plasmodium and others eukaryotic parasites". *Parasitology Today*, 7: 99-105; 1991.
171. Wabl M., Steinberg C., "Affinity maturation and class switching". *Current Opinion in Immunology*, 8: 89-92; 1996.
172. Cortese L., Pelagalli A., Piantedosi D., Mastellone V., Di Loria A., Lombardi P., Ciaramella P., Avallone L., "The effects of prednisone on haemostasis in leishmaniotic dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol". *Veterinary Journal*, 177: 405-410; 2008.