



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE CLINICHE E FARMACO-TOSSICOLOGICHE VETERINARIE

XXIV Ciclo

VALUTAZIONE DELLE CELLULE T REGOLATORIE IN CANI  
NATURALMENTE INFETTI DA *LEISHMANIA INFANTUM*

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Paolo Ciaramella

Docente guida:

Ch.ma Prof.ssa Laura Cortese

Candidato:

Dott.ssa Serena Serretiello

Triennio Accademico 2008-2011

# INDICE

## PARTE GENERALE

- La Leishmaniosi canina pagina 3

## PARTE SPERIMENTALE

- Introduzione pagina 14
- La Citofluorimetria pagina 19
- Materiali e metodi pagina 35
- Risultati pagina 38
- Discussione e conclusioni pagina 46
  
- BIBLIOGRAFIA pagina 49

## LA 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 (de Andrade, 2007).

### - Flebotomo -

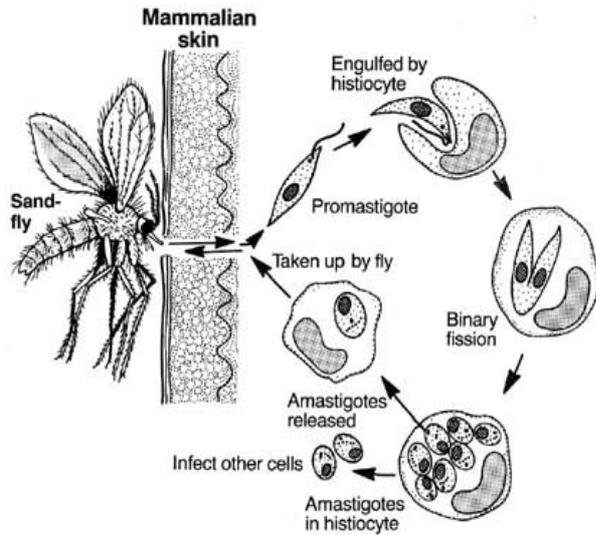


Il parassita del genere *Leishmania* è un protozoo endocellulare, appartenente al phylum *Sarcomastigophora*, classe *Zoomastigophorea*, ordine *Kinetoplastida*, famiglia *Tripanosomatidae*. Esistono numerose specie e sottospecie indistinguibili fra di loro morfologicamente e differenziabili solo per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

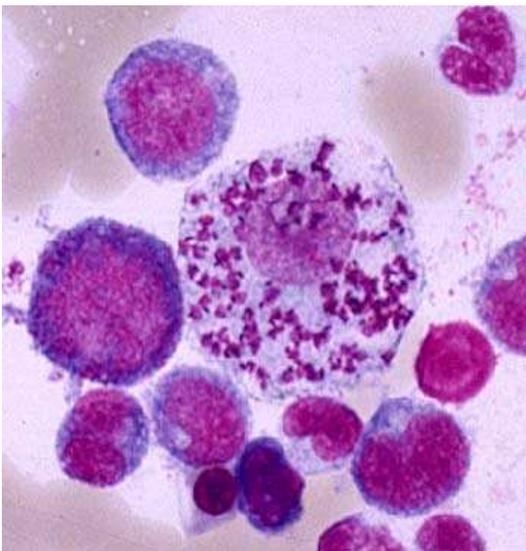
In particolare, le specie presenti in Europa e nel Bacino del Mediterraneo sono la *L. infantum*, *L. tropica* e *L. mayor*; nel resto del Mondo, risultano diffuse *L. donovani* (Africa, Asia e Russia) e *L. braziliensis* e *L. mexicana* (America Latina).

In Italia, lo *zimodema* responsabile della CL e di quella umana è il *Montpellier 1* (MON1) (Gradoni, 1989) 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 e 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. Da qui vengono poi 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).



**-Trasmissione del parassita -**



**-Forme amastigote all'interno di un macrofago-**

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. 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. 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, la volpe, il lupo e lo sciacallo nelle aree rurali dell'Asia Centrale, 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 *Larroussius* 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).

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. 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* (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. 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. 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).

La *gp 63* è una *zincometalloproteinas*i 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<sup>+</sup>-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. 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,

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*.

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+, 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- $\gamma$ ). 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.

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*) 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+.

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+ 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+ attraverso un meccanismo di feed-back negativo. 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. 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).

Di fondamentale importanza risulta la 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 altri agenti patogeni, 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 invasore con azione immunomodulatrice a favore dei Th2; inoltre, il sequestro degli antigeni del MHC II nei vacuoli parassitofori indurrebbe minore esposizione di membrana e, quindi, maggior attivazione dei linfociti Th2.

I lipofosfolipidi 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.

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 (inducibile *nitric oxide synthase*), essenziale per la distruzione dei parassiti intracellulari, mentre sembra favoriscano la produzione di IL-4.

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 linfocine 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 linfoidei (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.

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 (Terrazzano et al., 2006; Cortese et al., 2009, 2011).

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) (Cortese et al., 1999).

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. 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).

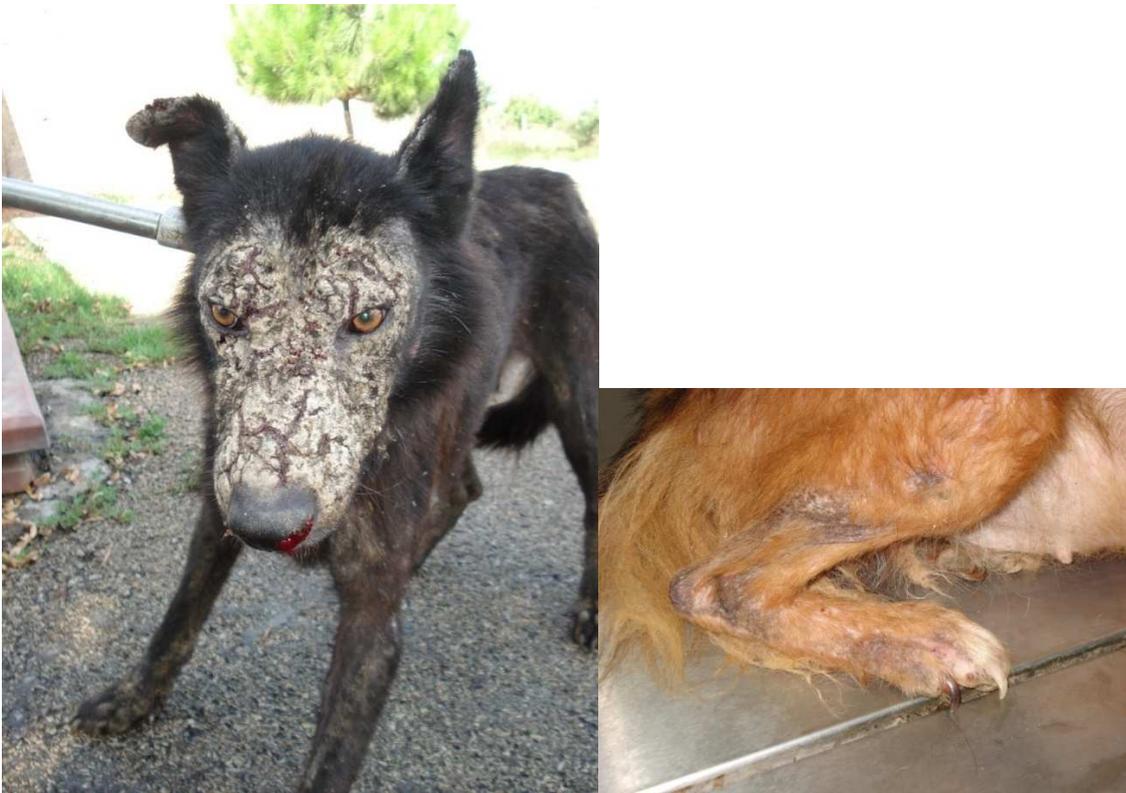
Nei cani malati, il polimorfismo sintomatologico rende, in taluni casi, la diagnosi clinica particolarmente impegnativa. Infatti, accanto ai classici segni di CL, quali linfadenomegalia, splenomegalia, dermatite furfuracea, onicogrifosi, uveite, cheratite, blefarite, negli ultimi anni sono stati descritti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

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). Nei soggetti leishmaniotici, le anomalie della coagulazione si esprimono clinicamente con epistassi, ematuria, colite emorragica, fenomeni trombo embolici (Ferrer et al., 1991; Bin hazim 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. 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 trombocitopenia potrebbero essere causate dall'azione di autoanticorpi anti-membrana piastrinica (Terrazzano et al., 2006; Cortese et al., 2009, 2011), 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 AMPc endopiastrinico e, quindi, una riduzione della reattività trombocitica. 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).

## INTRODUZIONE

Le caratteristiche cliniche della leishmaniosi canina possono ampiamente variare a seconda della capacità della risposta immunitaria dell'ospite di controllare la replicazione del parassita, determinando stati di malattia sub-clinica/asintomatica fino alla malattia conclamata (Reis et al., 2009)



- Cani naturalmente infetti da *L. infantum*, marcatamente sintomatici -

Diversi Autori hanno dimostrato che i cani affetti da leishmaniosi clinicamente manifesta presentano una risposta immunitaria, di tipo prevalentemente umorale, non protettiva (Th2), mentre i cani infetti che non sviluppano segni clinici di malattia, mostrano una risposta immunitaria preferenzialmente pro-infiammatoria e protettiva (Th1) (Pinelli et al., 1994, 1999; Ferrer et al., 2002; Chamizo et al., 2005). Inoltre, la caratterizzazione del profilo immunologico in cani con infezione da *L. infantum* è stata considerata come un elemento di primaria importanza per stabilire la prognosi e valutare la risposta al trattamento terapeutico (Papadogiannakis et al., 2009).

In letteratura sono state riportate molteplici variazioni dei livelli di linfociti e della loro efficacia funzionale in cani affetti da CL (Brandonisio et al., 1988; Bourdoiseau et al., 1997). In particolare, Miranda et al. (2007) hanno messo in evidenza variazioni nelle percentuali di CD3+ e CD4+ in cani con infezione da lieve a molto grave e Reis et al. (2006; 2009) hanno dimostrato che una più bassa presenza di linfociti B circolanti e di monociti può essere considerata come importante marker in caso di grave CL, mentre un aumento dei livelli di linfociti CD8+ sembra essere il principale immunofenotipo in corso di malattia asintomatica. Inoltre, il trattamento e i conseguenti miglioramenti clinici sono stati associati ad un incremento e/o normalizzazione dei livelli di cellule T, sia della sottopopolazione CD4+ che del rapporto CD4+/CD8+, oltre che della proliferazione cellulare antigene-dipendente in corso di CL (Moreno et al., 1999; Guarga et al., 2000, 2002; Papadogiannakis et al., 2010).

In corso di CL sono state descritte diverse alterazioni dell'emostasi quali epistassi, ematuria, diarrea emorragica e coagulazione intravascolare disseminata (Font et al., 1993; Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999; Ciaramella and Corona, 2003). Curiosamente, la presenza di trombocitopenia è stata riportata nel 29.3% dei casi di CL, mentre una deficienza dell'aggregazione piastrinica è stata evidenziata in tutti i cani infetti (Ciaramella et al., 1997; Ciaramella et al., 2005). Inoltre, recentemente è stata riportata un'associazione fra trombocitopenia e presenza di anticorpi diretti contro la membrana piastrinica in cani naturalmente infetti da *L. infantum* (Terrazzano et al., 2006; Cortese et al., 2009, 2011). Pertanto, si potrebbe dedurre che alcune delle suddette alterazioni

dell'emostasi potrebbero far parte di un complesso sistema di disregolazione immunitaria, probabilmente associato alla CL.

Una complessa rete di meccanismi, in gran parte aspecifici, è alla base del controllo della risposta immunitaria. I sistemi difensivi includono meccanismi intrinseci verso l'attivazione dell'antigene e verso la differenziazione dei linfociti T, ma a loro volta tali sistemi sono anche sotto il controllo della popolazione di cellule soppressorie, come rappresentato dalla recente individuazione delle sottopopolazioni di cellule CD4+ esprimenti il gene FoxP3 (Sakaguchi, 2005).

Le **cellule T regolatorie (Treg)** sono una sottopopolazione di cellule CD4+ la cui funzione è quella di sopprimere la risposta immunitaria e mantenere la tolleranza al self. Esse sono in grado di controllare le cellule effettrici in termini di espansione clonale, differenziazione, produzione di citochine e migrazione tissutale durante la risposta immunitaria.

La maggioranza di queste cellule esprime elevati livelli della catena  $\alpha$  (CD25) del recettore dell'interleuchina 2 (IL-2). Tali cellule sono generate dal timo, in seguito al riconoscimento di antigeni self, ma possono anche svilupparsi in organi linfoidi secondari. La generazione e la sopravvivenza delle Treg sono regolati soprattutto dalla citochine TGF- $\beta$  e IL-2. Inoltre, il fattore trascrizionale **FoxP3** svolge un ruolo cruciale nello sviluppo e nella funzione della maggior parte delle cellule T regolatorie. L'importanza del fattore FoxP3 è stata valutata tramite studi condotti sui topi: soggetti che possiedono mutazioni del gene FoxP3 o topi knockout per FoxP3 sviluppano una sindrome autoimmune multisistemica associata all'assenza di cellule T regolatorie CD25+. Nell'uomo si ritiene che mutazioni a livello del gene FoxP3 siano responsabili di una rara malattia autoimmune associata alla mancanza di cellule Treg, chiamata IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome) (Abbas. A K et al, 2008).

Particolarmente importante è il controllo che le Tregs esplicano sull'innescò dei linfociti T negli organi linfoidi, ma esse sono anche in grado di inibire la risposta immunitaria nei tessuti periferici (Miller et al. 2004; Heehn e Hamman, 2005; Sakaguchi, 2005).

Il ruolo delle Tregs nel prevenire risposte autoimmuni dannose e il loro coinvolgimento attivo nella modulazione della risposta immunitaria contro agenti infettivi (Belkaid e Tarbell, 2009) e contro cellule trasformate (Curiel et al., 2004) è stato ampiamente descritto in medicina umana.

L'importanza di questa sottopopolazione di linfociti T nei modelli tumorali canini è stata dimostrata solo di recente (Biller et al., 2007; Hourichi et al., 2009; O'Neill et al., 2009; Risetto et al., 2010). In particolare, Biller et al. (2007) hanno riportato che cani con diverse tipologie di tumori maligni mostrano un incremento proporzionale di Tregs nel sangue periferico e nei linfonodi di drenaggio della neoplasia, rispetto al sangue e ai linfonodi di soggetti controllo sani, suggerendo un importante ruolo prognostico svolto da questa linea cellulare. Alla stessa conclusione sono giunti O'Neill et al. (2009), che hanno ugualmente documentato un aumento delle Tregs nel sangue e nei linfonodi drenanti la neoplasia in cani affetti da malattia neoplastica, rispetto a cani di controllo sani. Infine, Hourichi et al. (2009) hanno documentato in cani con tumori metastatici una percentuale di Tregs significativamente più alta rispetto alla percentuale ritrovata in cani senza malattia metastatica. In medicina veterinaria non sono disponibili dati sul ruolo di questa popolazione cellulare nella regolazione della risposta immunitaria contro agenti infettivi. Alcuni Autori di recente hanno valutato la possibilità che la persistenza di un parassita nell'organismo possa condizionare la relazione reciproca tra le cellule proinfiammatorie  $T_H17$  (Iwakura et al., 2011) e le cellule Treg che esprimono il FoxP3 (Littman e Rudesky, 2010). Ciò farebbe ipotizzare un ruolo di primo piano nel rapporto tra la rimozione dell'agente patogeno e le reazioni immunitarie nelle infezioni da *L. infantum*.

In numerosi studi (Terrazzano et al., 2006; Rei et al., 2006; Miranda et al., 2007; Reis et al., 2009; Cortese et al., 2009, 2010; Alexandre-Pires et al., 2010; Papadogiannakis et al., 2010) è emersa in maniera significativa la prevalenza di un profilo immunitario alterato in corso di CL; i meccanismi che sottendono tale alterazione sono ancora largamente sconosciuti. Inoltre, non sono disponibili dati sui livelli di Treg in corso di CL.

Pertanto, lo scopo del presente studio è quello di indagare sul ruolo delle Tregs in cani naturalmente infetti da *L. Infantum*, concentrando in modo particolare l'attenzione sulla relazione tra i livelli di Tregs e il manifestarsi di cambiamenti specifici nelle sottopopolazioni di linfociti T, tramite l'impiego della citofluorimetria a flusso.

## LA CITOFUORIMETRIA

La *Citofluorimetria* (CFM) è una tecnica che consente l'analisi di popolazioni cellulari complesse, attraverso la quantificazione contemporanea di numerosi parametri fisici e molecolari di ogni singola cellula di cui la popolazione è composta.

L'analisi di una grande quantità di cellule in breve tempo, 1000 o più al secondo, è resa possibile da un sistema di flusso laminare che costringe le cellule ad allinearsi e passare una alla volta nella camera di analisi: per questo motivo, tale tecnica viene anche definita *citofluorimetria a flusso*.

Lo stadio differenziativo, lo stadio di maturazione o lo stato di attivazione di una cellula possono essere valutati analizzando l'espressione in membrana, o intracellulare, di molecole specifiche. Questa tecnica viene eseguita marcando la cellula con sonde fluorescenti che sono specifiche per queste molecole e misurando la quantità di fluorescenza emessa dalla cellula stessa.

Lo strumento utilizzato è il *citometro a flusso* che rileva la fluorescenza emessa da una singola cellula in sospensione e determina, inoltre, il numero delle cellule che esprimono la molecola a cui la sonda fluorescente si lega.

La comparsa della *citofluorimetria a flusso* avvenne intorno agli anni 70 (Kamentsky et al., 1965; van Dilla et al., 1985), determinando un veloce ed intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche e dando un notevole impulso agli studi sulla proliferazione cellulare; il suo scopo era di misurare proprietà multiple di singole cellule rapidamente, permettendo così una dettagliata analisi quali-quantitativa.

Inizialmente l'uso della citofluorimetria era limitato alla misura di uno-due parametri: uno per le misure fisiche del *light-scattering* – che tramite la spettroscopia ottica studia la diffusione di determinate lunghezze d'onda per ottenere informazioni su forma, dimensioni e dinamica delle particelle – e l'altro per la fluorescenza.

Il primo citofluorimetro in commercio fu l'Hemalog D nel 1974 che permise una prima distinzione tra granulociti neutrofili, eosinofili, basofili e monociti utilizzando una lampada alogena al tungsteno.

La CFM portò grande impulso allo studio del sistema immunitario, grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali (*Monoclonal Antibodies*, MoAb), marcati con fluoresceina isotiocianato (FITC) (Mathew e Goel, 2009).

Tuttavia, la grande complessità del sistema immunitario e la presenza di diverse sottopopolazioni, che reagivano con lo stesso anticorpo, stimolarono lo sviluppo di MoAb sempre più specifici, la ricerca di nuovi coloranti fluorescenti da coniugare agli anticorpi, senza modificare la loro capacità di legame all'antigene e con spettri distinti di emissione, e la creazione di citofluorimetri a flusso multiparametrici.

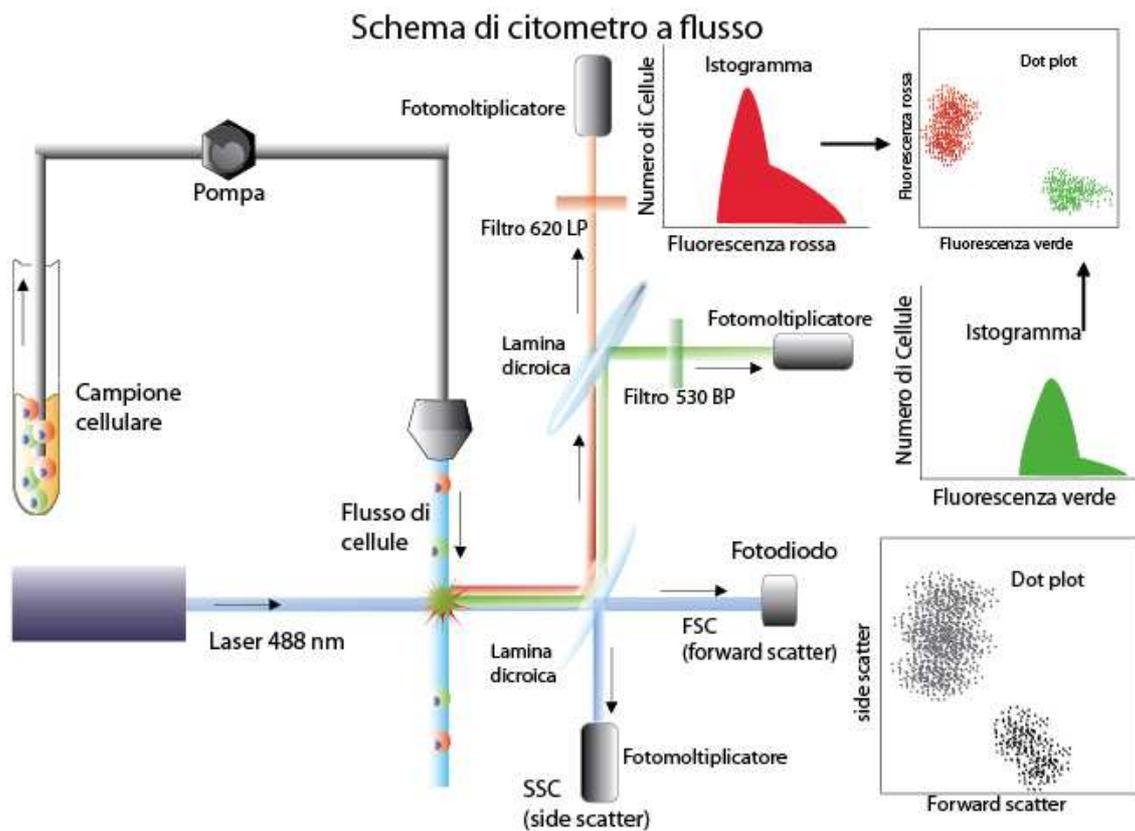
I primi esperimenti in doppia fluorescenza si avvalsero di MoAb coniugati con fluoresceina e rodamina, con il risultato però di una notevole sovrapposizione di spettri. Per superare tale inconveniente, furono sintetizzati derivati della rodamina (*Texas-Red*), che furono impiegati in combinazione con il FITC, attraverso l'uso di due sorgenti di eccitazione a 600 e 488 nm.

Una svolta nell'impiego della CFM fu lo sviluppo di coloranti come le *ficobiliproteine*, fluorocromi naturali solubili in acqua, fluorescenti a pH neutro, facilmente coniugabili con MoAb, con elevate rese quantiche. Un esempio è dato dalla ficoeritrina (PE) che viene eccitata dalla stessa lunghezza d'onda del FITC (488 nm) col quale può essere utilizzato per realizzare un sistema di rilevazione in doppia marcatura.

Negli ultimi anni la CFM ha raggiunto un'ampia diffusione sia in laboratori clinici che di ricerca, grazie alla possibilità di utilizzare più laser di emissione, consentendo quindi di effettuare analisi multiparametriche a quattro o più colori e alla disponibilità di MoAb marcati con un'ampia gamma di fluorocromi e diretti contro una larghissima varietà di antigeni (Ag) di membrana e/o intracellulari, i quali possono identificare la linea cellulare di appartenenza, la sottopopolazione, il grado di differenziazione cellulare, lo stato proliferativo, ma anche l'espressione di Ag aberranti

come nel caso di virus e oncogeni. Infine, anche la riduzione dei costi e della complessità nell'utilizzo dello strumento ha reso la CFM più accessibile.

## PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO DELLA CFM



Una sospensione cellulare monodispersa e marcata (cellule da sangue periferico, aspirato midollare, etc.) alla concentrazione ottimale di  $10^6$  cellule/ml viene iniettata in un sistema fluidico (camicia fluida o flusso laminare esterno), che tende a trasportare le cellule in maniera separata e ordinata fino al punto di misura dove incontra il fascio di luce focalizzata proveniente dal laser. Nel flusso coesistono una corrente interna ed una esterna, la quale confina la sospensione cellulare al centro del flusso. Al punto di intersezione tra i due flussi, il fluido del comparto contenente le cellule ha una velocità maggiore rispetto alla camicia fluida; a causa dell'effetto Bernoulli, le cellule sono spinte al centro del flusso e allineate (*focalizzazione idrodinamica*). La pressione di spinta e la diluizione del campione consentono di contare fino a qualche migliaia di cellule al secondo, presentando individualmente le cellule del campione alla stazione di misura dove intersecano il raggio di luce emesso dal laser. In tale fase è fondamentale evitare la formazione di aggregati cellulari. La velocità di efflusso delle cellule viene valutata come **numero di eventi al secondo**: numero di particelle che incontrano il raggio di luce nell'unità di tempo.

La concentrazione delle cellule influenza le caratteristiche del flusso laminare (prima di iniziare l'analisi, infatti, è sempre opportuno effettuare una conta cellulare, al fine di verificare l'utilizzabilità del campione).

L'incontro tra il raggio di luce e la singola cellula presente nel flusso cellulare (*stream*) genera dei segnali che sono legati alle caratteristiche fisiche della cellula e alla presenza di molecole fluorescenti. In particolare, la sorgente laser emette una luce monocromatica unidirezionale che, tramite un sistema di focalizzazione ottico, produce un fascio di forma ellittica che colpisce la parte centrale del flusso dove transitano le cellule singolarmente, le quali emettono segnali di luce diffusa in base alle proprie caratteristiche fisiche e morfologiche, per fenomeni di rifrazione, riflessione e diffrazione; atteso che le direzioni del fascio di luce di eccitazione, flusso cellulare e dell'asse ottico della lente di raccolta della fluorescenza sono reciprocamente perpendicolari, quando il raggio laser intercetta lo *stream* la maggior parte della luce incidente viene dispersa nel piano contenente il

raggio di luce. Poiché questa radiazione potrebbe essere di disturbo per le misure successive, viene bloccata da barrette di oscuramento.

La luce dispersa in avanti (**FSC**, *forward scatter*) è legata alle caratteristiche fisiche delle cellule ed è la quantità di luce trasmessa lungo lo stesso asse attraverso il quale viaggia il raggio luminoso e viene misurata da un fotodiodo posto frontalmente al percorso ottico della luce laser.

La quantità di luce che riesce a raggiungere il fotodiodo rilevatore, essendo legata alla diffrazione della luce da parte della cellula, è direttamente proporzionale alle sue dimensioni.

La dispersione laterale o ortogonale (**SSC**, *side scatter o 90° scatter*) viene rilevata da un tubo fotomoltiplicatore posto in posizione ortogonale alla sorgente luminosa; esso raccoglie in modo selettivo la luce deviata da ciascuna cellula a un angolo di 90° rispetto alla luce incidente.

La quantità di luce deviata a tale angolazione è legata alla rifrazione della luce da parte della cellula, perciò è in relazione proporzionale alla sua complessità interna (forma e dimensioni del nucleo, granularità del citoplasma che dipende dal tipo e dalla quantità di organelli intracitoplasmatici).

Queste informazioni vengono utilizzate per distinguere differenti tipi cellulari; ad esempio, risulta ovvio che la quantità di luce rifratta lateralmente da un granulocita è molto più elevata di quella rifratta da un linfocita, per la maggiore quantità di granulazioni citoplasmatiche e la maggiore irregolarità di forma del nucleo, così come i monociti generano una maggiore dispersione anteriore a causa della loro dimensione.

La combinazione di questi due tipi di segnale (FSC e SSC) permette di ottenere un **citogramma** (diagramma bidimensionale) che consente di discriminare tra diverse popolazioni cellulari, basandosi solamente sulle loro caratteristiche fisiche.

Il rilevamento e la quantificazione di molecole specifiche, invece, è reso possibile dallo studio di segnali fluorescenti generati dall'utilizzo di MoAb marcati con fluorocromi tramite legame indiretto (FITC, PE, APC, etc.) specifici per antigeni presenti sulla membrana, nel citoplasma e nel nucleo oppure da fluorocromi che si legano in maniera stechiometrica a determinate sostanze come il DNA e l'RNA, tramite legame diretto.

Il legame indiretto si serve di fluorocromi con buon assorbimento a lunghezza d'onda di 488 nanometri, fornita dal laser ad Argon, ed emettono nello spettro del verde, dell'arancio o del rosso. Per il legame diretto si utilizza più frequentemente il Propidio Ioduro che, legandosi direttamente al DNA, ne permette la quantificazione, ricavando dati sia sulla ploidia sia sulla quantità di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare ( $G_0/G_1$ , S,  $G_2/M$ ).

Ogni fluorocromo presenta una caratteristica lunghezza d'onda per l'eccitazione e l'emissione, pertanto le bande di emissione devono essere sufficientemente separate per permettere la loro appropriata misurazione.

A tale scopo, ogni tubo fotomoltiplicatore è preceduto da un filtro ottico che seleziona la lunghezza d'onda caratteristica del fluoro cromo in esame.

I filtri ottici si identificano con numeri che ne indicano la lunghezza d'onda di taglio e con sigle che ne definiscono la capacità di eliminare e trasmettere determinate bande di colore, al pari dei fotomoltiplicatori che hanno una loro banda ottimale di risposta.

La scelta del fluorocromo viene operata in base alla densità di espressione degli antigeni: per un antigene a bassa espressione è preferibile un fluorocromo ad alta efficienza quantica come la PE, mentre per gli antigeni a forte espressione si può ricorrere ad un fluorocromo ad efficienza quantica più bassa come la FITC

## COME “LAVORANO” I FLUOROCROMI

- Un laser eccita il fluorocromo;
- Il fluorocromo eccitato sale nel livello successivo della nuvola elettronica;
- Il fluorocromo ritorna a livello di partenza e rilascia l’energia in eccesso con fotone;
- I fotoni emettono a lunghezza d’onde maggiori rispetto a quelle a cui vengono eccitati. Es: la fluoresceina assorbe blu chiaro ed emette verde.

Laser	Excitation Laser Line (nm)	Fluorescence channel	Band Pass (nm)	Fluoro chrome
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

– Esempio di gamma di laser, lunghezze d’onda e fluorocromi –

## COME SI OTTENGONO COLORI DISTINTI

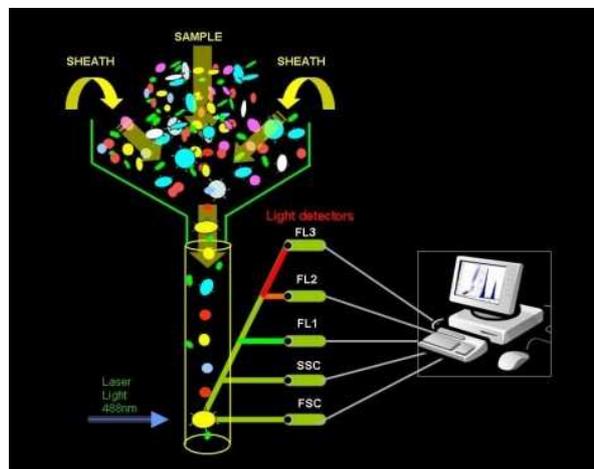
- Fluorocromi diversi hanno lunghezze d'onda diverse;
- L'eccitazione proviene dal laser. Ci sono 4 tipi di laser: 488 nm Blue; 633 nm Red; 405 nm Violet; 350 nm UV. La sorgente luminosa maggiormente utilizzata è quella a ioni Argon, con potenza che varia da 15 mWatt a 5 Watt, centrata su una lunghezza d'onda di 488nm (blu). Questa ha un costo elevato ma comunque più contenuto rispetto ad altre sorgenti luminose permettendo l'emissione di un ridotto numero di lunghezze d'onda ( 514, 488, 345 nm nelle versioni più potenti). Di conseguenza, volendo utilizzare lunghezze d'onda differenti sarà necessario utilizzare altri tipi di laser: Krypton, Elio Neon, Elio Cadmio, oppure una combinazione di quelli citati con notevole aumento delle spese di utilizzo e gestione;
- La lunghezza d'onda di emissione è più alta di quella di eccitazione;
- Usando filtri e specchi è possibile separare le diverse lunghezza d'onda.

Per quanto riguarda, invece, la scelta del pannello di anticorpi da utilizzare per un determinato campione, essa dipende dal sospetto clinico e dalla diagnosi differenziale posta dall'esame citologico della sospensione cellulare o dall'esame morfologico estemporaneo del tessuto da cui essa è stato ottenuto. Per le diverse patologie in studio è necessario standardizzare il pannello di anticorpi utilizzato, nonché i tipi di fluoro cromo con cui essi sono marcati in funzione del tipo di citofluorimento che si ha a disposizione.

## RILEVAZIONE E RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DEI DATI

I segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (*fotoiodi e fotomoltiplicatori*) che ne misurano l'intensità, trasformandoli in impulsi elettrici.

Infine, gli impulsi provenienti da ogni sensore, amplificati in modo da avere massimi di picco di qualche Volt e digitalizzati, sono inviati ad un analizzatore di dati che provvede alla loro visualizzazione sul monitor, alla rappresentazione grafica ed alla definizione statistica.



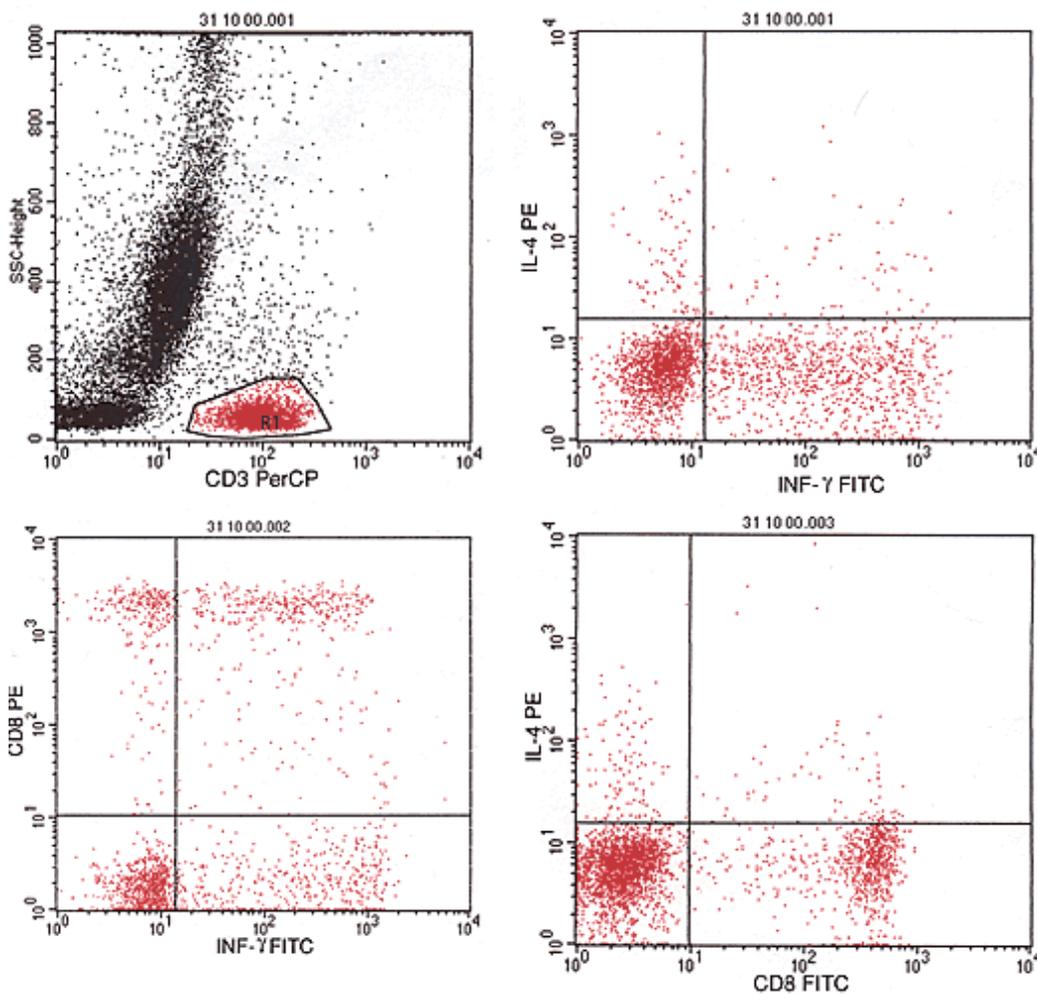
In alcuni casi è necessario utilizzare pre-amplificatori logaritmici in modo da esaltare segnali di bassa intensità e ridurre quelli ad alta intensità, sì da non ottenere sovrapposizione di segnale. Tali impulsi amplificati devono tuttavia essere ancora trasformati da segnali di tipo analogico a segnali digitali, per poter essere elaborati dal computer.

Il passo successivo è l'elaborazione dati, effettuata in passato da un analizzatore multicanale (multichannel analyzer, MCA), oggi sostituito da un pc che trasforma gli eventi analizzati in una rappresentazione grafica in tempo reale.

Esistono diversi modi per rappresentare un dato citofluorimetrico.

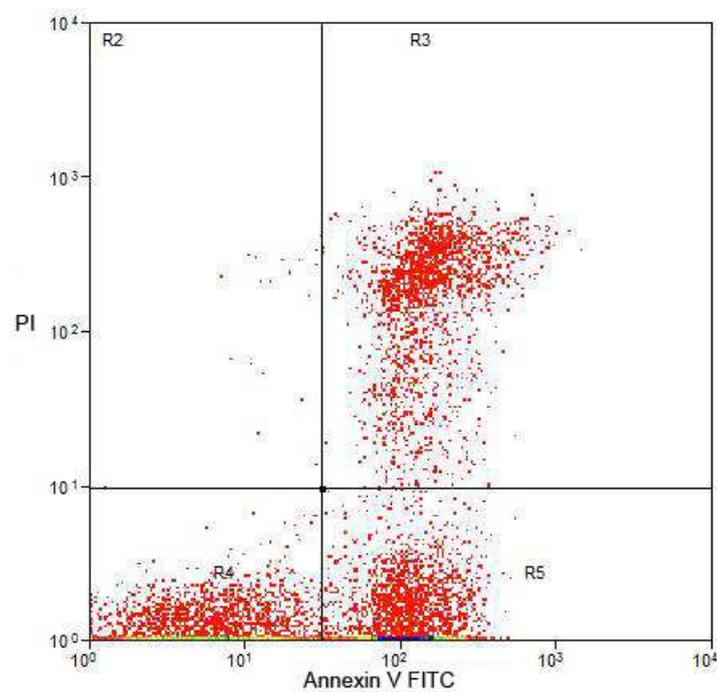
La rappresentazione più semplice è costituita dall'**istogramma**, dove l'ascissa riporta l'intensità della fluorescenza e l'ordinata il numero di cellule che esprimono o meno l'antigene (diagramma di distribuzione).

Il **citogramma**, invece, è una rappresentazione bidimensionale che permette di lo studio di parametri multipli per l'analisi delle popolazioni cellulari. Si tratta di un diagramma di dispersione nel quale ogni cellula è rappresentata da un puntino (evento) la cui posizione su un piano cartesiano ne identifica le proprietà analizzate. Viene anche definito grafico a punti o **dot plot**. Combinando i segnali FSC e SSC otteniamo un citogramma che evidenzia diverse sottopopolazioni cellulari nel campione in esame.



Esempi di dot plot –

Passo fondamentale è la selezione elettronica delle cellule da esaminare, delimitando un gate di osservazione. Infatti, attraverso questa finestra possiamo isolare alcune sottopopolazioni cellulari, in base a determinati parametri, e successivamente valutare per le stesse altre caratteristiche che altrimenti non sarebbero adeguatamente evidenziate.



– Esempi di gate –

Ovviamente, utilizzando fluoro cromi specifici per particolari componenti cellulari e/o anticorpi marcati, otteniamo un ulteriore differenziazione delle cellule.

Al momento dell'analisi è fondamentale la **compensazione**, che ha lo scopo di sottrarre da una determinata valutazione visiva una quota fissa di segnale relativo all'emissione di un altro fluorocromo.

Infatti, nonostante il complesso sistema di lenti, di specchi e filtri, e l'attenzione posta nella selezione di fluoro cromi con spettri di emissione separati, può succedere che una radiazione di una

certa intensità di un fluorocromo si sovrapponga alla lunghezza d'onda del fluorocromo successivo. Ad es. si sottrae dal canale del PE (rosso) una quota fissa di segnale dovuto all'interferenza del FITC (verde) e viceversa.

Altre modalità di rappresentazione bidimensionale comprendono il **contour-plot**, che ci consente di visualizzare aree aventi la stessa densità mediante linee concentriche, oppure la **pseudo color plot** e la **density plot**, dove l'intensità del colore è proporzionale alla densità degli eventi.

In ultimo, va ricordato che l'analisi di ogni campione deve includere l'inserimento di controlli adeguati da utilizzare nel corso dell'analisi e della interpretazione dei dati.

- Un campione non marcato per la valutazione dell'*autofluorescenza* delle cellule in studio; dove però si effettuano marcature che daranno debole intensità di colorazione, questo fenomeno è il fattore limitante il potere risolutivo della CFM;
- Anticorpi non reattivi dello stesso isotipo e coniugati con lo stesso fluorocromo degli anticorpi utilizzati per avere informazioni sui possibili legami aspecifici (*fluorescenza di fondo*);
- Un campione di riferimento i cui valori siano conosciuti e costanti nelle analisi che sfruttano il legame diretto di un fluorocromo alle molecole (studio del contenuto di DNA).

## APPLICAZIONI DELLA CITOFUORIMETRIA

La citofluorimetria è una tecnica potente e informativa che ha assunto grande rilievo sia in anatomia patologica sia nel laboratorio di analisi chimico-cliniche con applicazioni nei campi dell'ematologia, oncologia, microbiologia, infertilità, nonché nelle malattie infiammatorie ed immunitarie. Costituisce il prototipo di una tecnica di analisi *multiparametrica*, ovvero un approccio metodologico che consente di effettuare simultaneamente il dosaggio di differenti analiti, in un singolo campione, attraverso un singolo processo di misurazione.

I limiti di questa tecnica sono legati alla necessità di ottenere cellule in forma vitale e alla perdita della morfologia del campione.

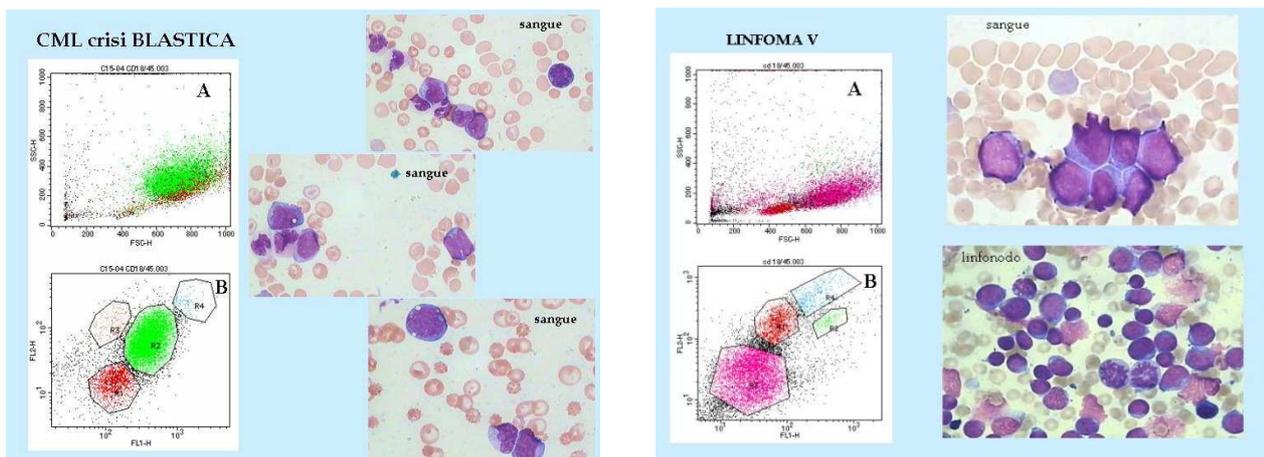
I vantaggi riguardano l'utilizzo di piccoli campioni, la multiparametricità, la notevole sensibilità che consente di evidenziare piccole sottopopolazioni, la rapidità di esecuzione e la possibilità di recuperare sottopopolazioni pure in provette separate per ulteriore analisi. Infatti, modelli avanzati di citofluorimetri consentono la separazione fisica di differenti popolazioni cellulari identificate secondo parametri richiesti dall'operatore e destinate, ad esempio, a tecniche di biologia molecolare.

I principali campi di applicazione sono:

- **Studio della ploidia e della proliferazione cellulare.** Una delle caratteristiche morfologiche della trasformazione di una cellula normale in una cellula neoplastica è l'aumento delle dimensioni dei nuclei e della densità della cromatina a causa dell'aumento del contenuto di DNA. Marcando il DNA con fluorocromi possiamo quantificare e quindi ricavare dati sia sulla ploidia ( numero base di cromosomi per un determinato organismo) sia sul ciclo cellulare, per comparazione con cellule a contenuto noto e costante di DNA. In fase di riposo  $G_0/G_1$ , infatti, una cellula contiene una quantità normale di DNA, che va duplicandosi sul finire della fase S ed in fase  $G_2/M$ , mentre durante la fase S ogni cellula contiene quantità variabili di DNA. Si deduce che l'applicazione più importante dello studio della ploidia in campo oncologico è rappresentata dal suo utilizzo in corso di analisi multiparametrica così da identificare la sottopopolazione da indagare tramite CFM.
- **Analisi del ciclo cellulare.**
- **Risposta del sistema immunitario alla somministrazione di vaccini.**
- **Livelli di apoptosi in patologie associate a deplezione cellulare (AIDS) o accumulo cellulare (tumori).** Una delle applicazioni principali è il riconoscimento dei profili immunofenotipici nella diagnosi delle neoplasie ematologiche. Il campione utilizzato è una sospensione di cellule, a concentrazione ottimale di  $10^6$  cellule/ml ottenute dal sangue, midollo osseo, versamenti, tessuto

disgregato. La fase preparatoria (fase pre-analitica) è uno dei momenti più delicati dell'intera procedura: fattori quali vitalità cellulare, rapporto cellule/ anticorpo, pH del mezzo, temperatura e tempi di incubazione, numero di lavaggi possono influenzare la qualità del risultato e, soprattutto, la riproducibilità analitica del risultato stesso.

L'immunofenotipizzazione mediante CFM fornisce risultati in meno di tre ore dal rinvenimento del campione, qualunque sia la sua origine. Appare chiaro come l'analisi immunofenotipica abbia un ruolo determinante per quelle neoplasie mielo e linfoproliferative per le quali la strategia terapeutica dipende dal profilo immunofenotipico. Inoltre, tale tecnica fornisce informazioni prognostiche ed è anche un mezzo sensibile per il monitoraggio della malattia dopo chemioterapia o trapianto di midollo osseo. In ultima analisi, la CFM trova applicazione anche come strumento di studio della cosiddetta *malattia residua minima* definita come persistenza di cellule neoplastiche nel midollo osseo come in altri tessuti di pazienti con neoplasie apparentemente in remissione, cioè in quei casi non rilevabili dall'analisi morfologica la quale ha un limite di sensibilità del 5% al contrario dell'analisi immunofenotipica con sensibilità di  $10^{-2}$  cellule.



– Utilizzo in corso di patologie neoplastiche –

Solo la PCR (Polymerase Chain Reaction) offre maggiore sensibilità rispetto alla CFM, con il vantaggio che quest'ultima è più semplice e rapida.

- **Analisi immunofenotipica multiparametrica:** permette di affrontare i problemi biologici della eterogeneità cellulare sfruttando due operazioni fondamentali della CFM, il *Gating* e il *Sorting* (Martinez- Osorio et al., 2009).

Il *Gating* permette di isolare una determinata popolazione da tutte le altre cellule e di analizzare i parametri successivi solo all'interno della popolazione "ghettata", dividendola in ulteriori popolazioni, utilizzando una finestra elettronica.

Il *Sorting* consente di raccogliere fisicamente le popolazioni che sono state separate dal resto della miscela. Si stabiliscono delle finestre di selezione per identificare le popolazioni di interesse che verranno separate e raccolte in provette distinte. Le cellule mantengono la vitalità dopo il *Sorting*.

## LA MACCHINA DA NOI UTILIZZATA

BD FACSCalibur™ system: apparecchio a doppio laser e quattro colori che consente l'analisi cellulare e il Sorting.



–

**FACS Calibur™ system –**

## MATERIALI E METODI

### *1. Animali e procedure diagnostiche*

Prima di includere gli animali nello studio, i proprietari furono informati circa gli scopi della ricerca e sulla natura dei metodi impiegati, richiedendo esplicitamente il loro consenso.

Per il presente studio, sono stati reclutati 20 cani, di età media (4-5 anni), di ambo i sessi (10 maschi e 10 femmine), naturalmente infetti da *Leishmania infantum* e residenti nella regione Campania. Nessuno dei soggetti aveva ricevuto alcun farmaco specifico per il trattamento della leishmaniosi da almeno sei mesi prima dell'inizio dello studio. In base all'esame clinico, i cani infetti sono stati classificati come asintomatici/oligosintomatici, secondo la classificazione proposta da Ciaramella e collaboratori (1997). La diagnosi clinica di CL è stata sempre confermata da:

- a) Esame parassitologico basato sulla evidenziazione di amastigoti in aspirati linfonodali e/o midollari;
- b) Esame sierologico (valutazione del titolo anticorpale mediante test di immunofluorescenza indiretta - IFAT), considerando come sicuramente positivi gli animali con un titolo sierologico  $\geq 1:160$ ;
- c) Nested-PCR (Polymerase Chain Reaction) a partire da campioni midollari e/o campioni di sangue (buffy coat). (Oliva et al., 2006).

In tutti i soggetti inclusi nella ricerca, inoltre, è stata esclusa la presenza di altre malattie infettive (Ehrlichiosi, Anaplasmosi, Babesiosi e Dirofilariosi); a tale scopo, sono state condotte analisi IFAT

e PCR, nonché sono stati ricercati su strisci di sangue periferico *morule* di *Ehrlichia canis* e *Anaplasma phagocytophilum*, trofozoiti di *Babesia canis* e microfilarie di *Dirofilaria immitis*.

Quest'ultimo agente infettivo, infine, è stato escluso anche mediante l'impiego di uno “*Snap Canine Combo Heartworm Antigen Antibody Test*” (IDEXX Laboratories).

Dieci cani clinicamente sani (5 maschi e 5 femmine), di 5-6 anni di età, negativi a tutte le malattie infettive precedentemente menzionate, hanno costituito il *gruppo di controllo*.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo a quanto previsto dalla vigente normativa nazionale.

## *2. Raccolta dei campioni e valutazioni ematologiche ed ematochimiche*

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare, dopo un periodo di digiuno di almeno 12 ore e raccolti in provette contenenti *EDTA* (Ethylene-Diamino-Tetraacetic Acid); entro 30 minuti dal prelievo, sono stati effettuati sui campioni di sangue esami emocromocitometrici completi, mediante un contaglobuli semiautomatico (Genius S; SEAC Radom Group Firenze, Italia), oltre alle valutazioni citofluorimetriche del caso. Si è provveduto, altresì ad ottenere campioni di siero, mediante centrifugazione a 300 g per 15 minuti entro un'ora dal prelievo, per l'esecuzione di indagini ematochimiche (valutazione della funzionalità renale ed epatica, valutazione delle proteine plasmatiche).

## *3. Anticorpi monoclonali, immunofluorescenza e citofluorimetria a flusso.*

Nello studio sono stati utilizzati anticorpi monoclonali (MoAb) diretti contro le molecole CD3, CD4, CD8 e CD45, marcati con i fluorocromi FITC, PE, Cychrome e APC (Serotec Ltd di Londra, UK). Per l'analisi dell'espressione del fattore trascrizionale FoxP3 è stato utilizzato un anticorpo monoclonale crossreattivo diretto contro la molecola murina (Clone FJK-16s, eBioscience, San Diego, CA) e marcato con il fluorocromo PE. La marcatura intracellulare è stata ottenuta mediante utilizzo di un kit di permeabilizzazione (FoxP3 Staining Set, eBioscience), seguendo il protocollo consigliato dalla casa produttrice, come descritto da Biller et al. (2007). L'analisi fenotipica è stata effettuata su sangue intero, mentre la colorazione di FoxP3 è stata effettuata su cellule mononucleate (PBMC), ottenute mediante centrifugazione dei campioni di sangue venoso periferico su un gradiente di Ficoll, come descritto da Biller et al. (2007). Le sottopopolazioni linfocitarie CD4 e CD8 sono state definite mediante doppia colorazione con la combinazione anticorpale anti-CD3/anti-CD4 e anti-CD3/anti-CD8, rispettivamente.

L'analisi fenotipica è stata costantemente effettuata sulla regione delle cellule linfoidi, identificata utilizzando i parametri forward scatter (FSC, grandezza cellulare), side scatter (SSC, complessità cellulare), nonché mediante la marcatura con l'anticorpo anti-CD45. L'analisi citofluorimetrica dei campioni e la valutazione analitica dei dati sono state effettuate utilizzando un citofluorimetro *FACScalibur* a doppio laser e il programma di analisi *CellQuest analysis software* (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

#### *4. Analisi statistica*

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test di Mann-Whitney e lo Spearman's rank correlation test (*GraphPad Prism*, San Diego, CA). I risultati sono stati considerati statisticamente significativi con un valore di  $P < 0.05$

## **RISULTATI**

### *1. Valutazione dei parametri ematologici nei cani affetti da Leishmania infantum*

I risultati degli esami emocromocitometrici dei cani infetti sono riportati nella Tabella n.1.

Come è possibile osservare nella tabella acclusa, la conta piastrinica oscillava da un minimo di 83,000/ $\mu$ L ad un massimo di 392,000/ $\mu$ L, ma solamente quattro cani mostravano una ridotta conta piastrinica (cani numero 3, 7, 9, 13). In tre cani era rilevabile una lieve anemia normocromica normocitica (cani numero 10, 14, 20), che, al contrario, in altri quattro soggetti si presentava con caratteri di maggiore gravità (cani numero 6, 7, 8, 9). Solo in un cane, infine, era rilevabile un'anemia ipocromica microcitica (cane numero 11).

I cani sani inclusi nello studio mostravano un profilo ematologico assolutamente normale (dati non riportati).

**Tabella 1 – Profilo ematologico di cani naturalmente infetti da *L. Infantum***

<b>CANI</b>	<b>WBC</b> (x 10 <sup>3</sup> µl)	<b>RBC</b> (x 10 <sup>6</sup> µl)	<b>HGB</b> (g/dl)	<b>HCT</b> (%)	<b>MCV</b> (fl)	<b>MCH</b> (pg)	<b>MCHC</b> (g/l)	<b>PLT</b> (x 10 <sup>9</sup> l)
1	9.3	7.38	17.8	50.7	69	24.1	35.0	391
2	13.7	7.71	18.6	54.4	71	24.2	34.3	296
3	15.8	6.68	15.5	44.9	67	23.2	34.5	96
4	7.5	8.11	20.1	57.8	71	24.8	34.8	298
5	7.6	8.13	20.1	57.9	71	24.8	34.8	283
6	13.7	4.38	10.2	29.3	67	23.2	34.7	344
7	16.5	4.86	11.4	31.6	65	23.4	35.9	125
8	12.3	4.33	10.9	31.8	74	25.3	34.3	206
9	9.7	4.51	11.2	32.4	72	24.8	34.5	83
10	11.5	5.3	12.9	35.2	67	24.5	36.6	220
11	11.0	5.08	7.1	21.5	42.3	13.9	33.0	190
12	9.4	7.99	19.3	55.3	69	24.1	34.8	203
13	15.4	6.46	14.9	42.7	66	23.1	34.9	124
14	11.8	5.3	13.2	35.9	67	24.8	36.8	240
15	12.4	7.9	20.6	58.5	74	26.0	35.2	246
16	9.0	8.13	18.5	54.7	67	22.8	33.9	202
17	9.3	6.92	17.4	49.9	72	25.1	34.9	173
18	9.8	6.74	17.4	50.3	75	25.9	34.7	276
19	12.9	6.17	15.2	43.5	70	24.7	35.0	392
20	16.8	5.3	13.2	35.9	67	24.8	36.8	256

2. I cani naturalmente infetti da *Leishmania infantum* mostravano un significativo incremento dei linfociti T citotossici.

Il ruolo critico svolto dall'immunità cellulo-mediata nel controllo di protozoi intracellulari, come ad esempio la *L. infantum*, è stato ormai ampiamente documentato. (Pinelli et al., 1994, 1995; Bourdoiseau et al., 1997; Miranda et al., 2007; Reis et al., 2006, 2009). Noi abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle principali sottopopolazioni di linfociti T, linfociti T helper (CD4+CD3+) e T citotossici (CD8+CD3+). Tali popolazioni sono state analizzate mediante immunofluorescenza e analisi citofluorimetrica multiparametrica. Questa tecnica permette di identificare singole sottopopolazioni cellulari nell'ambito di popolazioni più eterogenee, senza l'impiego di procedure di arricchimento/purificazione, mantenendo dunque la complessità biologica fisiologica. Le analisi sono state eseguite su sangue intero e le diverse sottopopolazioni cellulari sono state identificate grazie alla co-espressione della molecola CD3, la cui espressione è strettamente dipendente dalla presenza del recettore dell'antigene delle cellule T (TCR). Come si può evincere dalla Figura 1-A, gli animali infetti da *L. infantum* mostravano un significativo incremento ( $P<0.005$ ) della percentuale di linfociti T citotossici (CD8+CD3+) rispetto ai cani del gruppo controllo. In particolare, l'aumento di tale sottopopolazione linfocitaria è stato ulteriormente avvalorato da una concomitante riduzione, statisticamente significativa ( $P<0.005$ ), del rapporto CD4/CD8, sempre nell'ambito dei cani infetti (Figura 1-B). I valori numerici assoluti hanno confermato le nostre osservazioni sui dati in percentuale.

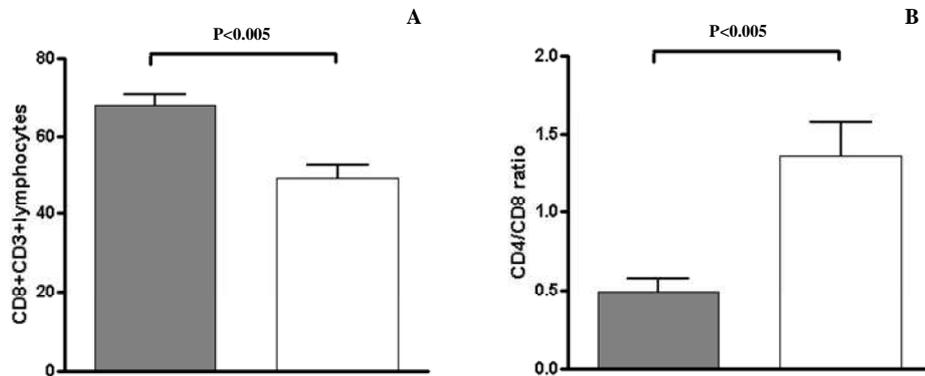


Figura n.1

**Fig.1 Significativo incremento della sottopopolazione di linfociti CD8+ con diminuzione del rapporto CD4+/CD8+.**

I due grafici mostrano i dati ottenuti dall'analisi dei livelli linfocitari di CD8+, Cd3+ ed il rapporto CD4+/CD8+ nel sangue periferico di cani infetti (colonna grigia) confrontati con animali sani (colonna bianca). L'analisi statistica è stata ottenuta con il test di Mann-Withney.

### 3.3 I cani naturalmente infetti da *Leishmania infantum* mostravano una riduzione delle cellule T regolatorie, inversamente correlata con i livelli di linfociti Tcitotossici (CD8+).

Il reclutamento e l'espansione di linfociti T citotossici, in un microambiente infettato da microrganismi, è un fenomeno finemente regolato da una serie di meccanismi periferici in grado di prevenire o modulare il verificarsi di fenomeni immuno-patologici. Tali sistemi di regolazione sono intrinseci al segnale antigene-dipendente o mediati dall'attivazione di popolazioni cellulari soppressorie, quali le cellule T regolatorie (Treg). Allo scopo di analizzare tale aspetto, abbiamo

quantizzato i livelli di Treg nella coorte di animali naturalmente infetti da *L.infantum*, comparandola con i cani sani reclutati nello studio. La figura 2 mostra un esperimento tipico in cui il livello di linfociti T regolatori è stato definito mediante immunofluorescenza e analisi citofluorimetrica multiparametrica quantizzando la popolazione linfocitaria CD4+Foxp3+. Come mostrato, l'espressione di Foxp3 è stata valutata nella regione delle cellule CD3+CD4+, in un animale naturalmente infetto da *L. infantum* (pannello A) e in un controllo sano (pannello B). L'analisi mostra una chiara diminuzione delle cellule Treg negli animali infetti rispetto ai sani (3.66% versus 9.5%).

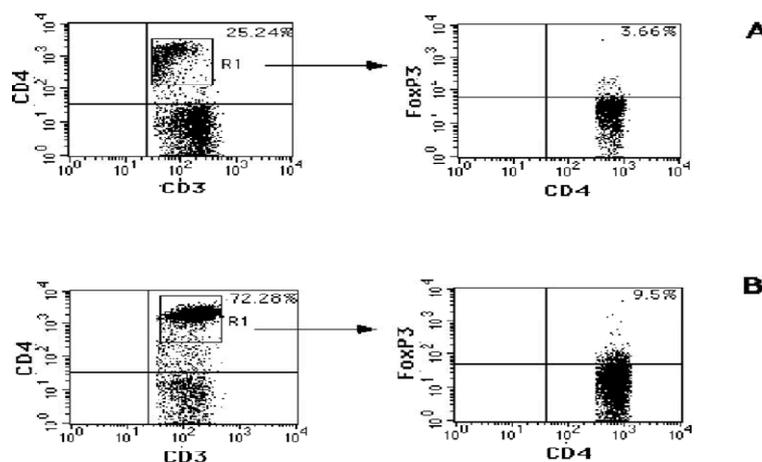


Figura n. 2

**Fig.2: I cani con CL mostrano una riduzione nell'espressione del FoxP3(CD4+) nell'ambito delle cellule Treg.** I due grafici mostrano l'espressione del FoxP3 nella regione di linfociti CD4+CD3+ valutata sia in un cane con *L.infantum* che nel controllo sano. Il fattore FoxP3 è stato evidenziato nella regione CD4+ (R1) selezionata nella popolazione totale di CD3.

Nella figura 3 è stata invece riportata l'analisi statistica comparativa tra i dati ottenuti dagli animali infetti e quelli ottenuti dagli animali sani (gruppo controllo). I linfociti Treg apparivano ridotti in maniera statisticamente significativa ( $P < 0.01$ ) nel sangue periferico dei cani infetti. Tali dati sono stati confermati attraverso l'analisi dei valori assoluti di Treg (dati non riportati).

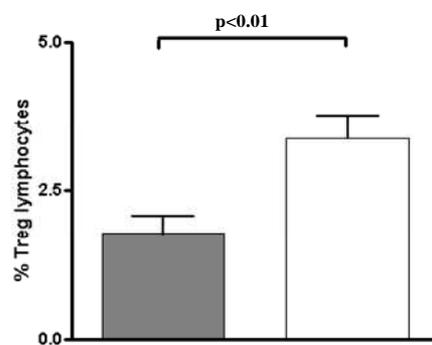


Figura n. 3

**Fig.3: La percentuale di cellule Treg che esprimono il FoxP3 è notevolmente diminuita nei soggetti infetti.** Le due colonne, grigia e bianca, mostrano un'analisi comparativa dei livelli periferici di Treg rispettivamente in animali con infezione da *L. infantum* ed in cani controllo sani. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test di Mann- Withney.

Allo scopo di verificare se la riduzione dei livelli di cellule T regolatorie possa essere correlata all'incremento delle cellule effettrici citotossiche in cani naturalmente infetti da *L. infantum*, sono stati comparati il rapporto tra la percentuale di cellule Treg, con i livelli periferici di cellule CD8+, CD3+ e con il rapporto CD4+/CD8+, nei cani sani e nei cani infetti, mediante l'applicazione dello Spearman's rank correlation test, così come descritto da Reis et al. (2006).

Dalla lettura della figura 4, è possibile riscontrare un'importante correlazione negativa tra Treg e linfociti CD8+ CD3+, nei cani infetti da *L. infantum* (Spearman  $r = -0.59$ ;  $P < 0.005$ ), mentre nessuna relazione statisticamente significativa è stata evidenziata nei cani sani (Spearman  $r = -0.43$ ;  $P = \text{NS}$ ).

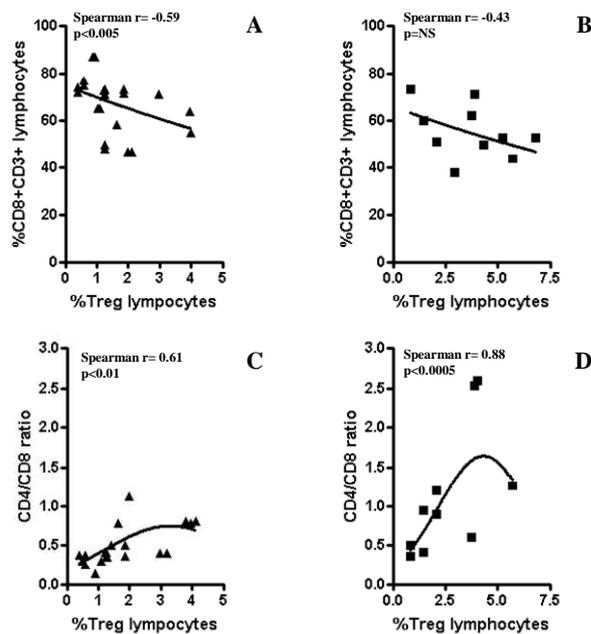


Figura n. 4

**Fig.4: Correlazione negativa tra le cellule T citotossiche effettrici ed i livelli di Treg in cani con infezione da *L. infantum*.** I due grafici, A e B, mostrano, rispettivamente, la correlazione esistente tra Treg e livelli di CD8+CD3+ in cani con leishmaniosi e cani controllo sani. E' stato dimostrato un'importante correlazione negativa solo nel gruppo di soggetti malati. I grafici, C e D, riportano, rispettivamente, la correlazione tra Treg e rapporto CD4+/CD8+ in cani infetti e sani. Come mostrano i grafici, è stata dimostrata una significativa correlazione positiva in entrambi i casi. Indici di correlazione di Spearman (valori  $r$  e  $p$ ).

Inoltre, è stata evidenziata una correlazione positiva tra la sottopopolazione di Treg ed il rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> sia nei cani sani (Spearman  $r= 0.88$ ;  $P<0.0005$ ), che in quelli infetti (Spearman  $r= 0.61$ ;  $P<0.01$ ). I nostri risultati evidenziano una generale correlazione tra le cellule Treg ed il rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in condizioni fisiologiche, mentre nel caso di animali con infezione da *L. infantum* si riscontra una correlazione negativa tra le Tregs e le cellule effettrici citotossiche.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il nostro studio ha messo in evidenza come in corso di CL l'incremento della quota periferica di linfociti CD8+CD3+ sia significativamente correlato ad una riduzione della sottopopolazione di Treg.

Il ruolo di primo piano dell'immunità adattativa nell'eliminazione dei parassiti intracellulari è stato largamente dimostrato (Pinelli et al., 1994, 1995; Bourdoiseau et al., 1997; Miranda et al., 2007; Reis et al., 2006, 2009). In particolare, gli agenti patogeni normalmente sfuggono all'iniziale risposta dell'ospite, dando vita ad infezioni croniche di lunga durata e favorendo così la trasmissione della patologia. Nel caso di molti protozoi (es. *Leishmania infantum*), l'evoluzione cronica è caratterizzata da uno stato di latenza nel quale la replicazione del parassita è minima e l'infezione resta mascherata. La cronicità potrebbe trovare le sue basi nella messa a punto di eccellenti meccanismi di immunoregolazione, che prevengono l'eliminazione del parassita e sopprimono la risposta immunitaria dell'ospite.

Numerosi studi dimostrano una riduzione della percentuale delle cellule T CD4+ nei cani affetti da *Leishmania* (Brandonisio et al., 1988; Bourdoiseau et al., 1997; Guarga et al., 2000; Reis et al., 2006). Pinelli et al. (1999) suggeriscono che le cellule CD8+, dipendenti dalla produzione di interferone, e la lisi dei macrofagi infettati da *L. infantum* mediano la protezione immunitaria durante tale infezione. Infatti, recenti studi dimostrano che l'aumento del numero di cellule effettrici CD8+ caratterizza gli animali asintomatici (Reis et al., 2006, 2009). I nostri dati dimostrano che un significativo aumento dei livelli di cellule T citotossiche, rispetto a livelli normali della popolazione linfocitaria totale come le cellule CD3+ può essere evidenziato in cani naturalmente infetti da *L. infantum*. Questa osservazione conferma l'importanza di tale sottopopolazione cellulare nel controllo della risposta immunitaria contro i parassiti intracellulari (Pinelli et al., 1997). Inoltre,

nella leishmaniosi, i macrofagi rappresentano la residenza esclusiva dei parassiti, e le cellule CD8+ possono essere altamente protettive, in particolare nell'acquisire resistenza alla reinfezione del parassita (Muller et al., 1989).

Lo studio dei meccanismi di regolazione del sistema immunitario nelle infezioni parassitarie è stato utile per dimostrare una complessa, ma coordinata ed equilibrata rete di interazioni immunitarie nella risposta immunitaria anti-parassitaria. In letteratura è stato riportato come la sottopopolazione delle cellule T regolatorie possa essere significativamente modulata nel reclutamento e nell'attivazione degli effettori, sia della risposta innata, che della risposta citotossica (Miller et al., 2004; Huehn and Hamann, 2005; Sakaguchi, 2005).

Questa sottopopolazione di cellule può essere prodotta nel timo allo scopo di controllare le risposte delle cellule T nei vari distretti (Sakaguchi, 2005). Inoltre, è stata dimostrata la possibilità che l'attivazione delle Treg possa avvenire negli organi periferici, partendo da cellule T naive (Littman and Rudensky, 2010).

Una volta che il sistema immunitario è stato attivato da un agente infettivo, le proteine della fase acuta (ad es., IL-6 o altre citochine pro-infiammatorie) potrebbero inibire la produzione di cellule Treg attivate e promuovere la produzione di cellule T<sub>H</sub>17 pro-infiammatorie (Littman and Rudensky, 2010; Iwakura et al., 2011), una terza citochina prodotta da una popolazione di cellule T, fortemente coinvolta nella persistenza del micro-ambiente pro-infiammatorio ed in genere associata all'insorgenza di autoimmunità.

Un incremento delle cellule T regolatorie in corso di leishmaniosi è prevista allo scopo di ostacolare le risposte infiammatorie necessarie per eliminare le cellule infette, aumentando il rischio che una incontrollata crescita del parassita possa causare gravi alterazioni. Al contrario, un aumento tardivo delle cellule regolatorie nei tessuti infetti è in grado di prevenire l'insorgenza di una grave patologia immunomediata. I nostri risultati indicano che, in corso di infezione attiva da CL, una risposta infiammatoria rappresentata da aumentati livelli periferici di cellule T citotossiche,

potrebbe essere supportata da un notevole decremento dei meccanismi di regolazione cellulo-mediata, come è testimoniato dalla riduzione della sottopopolazione Treg. In questo contesto, la persistenza del parassita potrebbe rappresentare un potente elemento di attivazione in grado di mantenere una risposta citotossica immunitaria attiva, riducendo i meccanismi di modulazione dipendenti dalle Treg. E' stata ipotizzata, infatti, la possibilità che tale scenario sia alla base di numerose patologie immunomediate (Lopez et al., 1996; Margarito et al., 1998; Terrazzano et al., 2006; Cortese et al., 2009, 2011), ampiamente riscontrabili in corso di CL.

Infatti in molte malattie infettive croniche, compresa la CL, è possibile evidenziare la presenza di diverse manifestazioni immunopatologiche (Lopez et al., 1996; Margarito et al., 1998); ad esempio in tale infezione possono comparire coagulopatie spesso legate a trombocitopenia e/o trombocitopatia. (Ciaramella et al., 1997; Ciaramella et al., 2005, Petadines et al., 2008). E' stato recentemente dimostrato che queste alterazioni dell'emostasi primaria possono dipendere prevalentemente dalla presenza di anticorpi antiplastrine. (Terrazzano et al., 2006; Cortese et al., 2009, 2011). I nostri risultati dunque potrebbero fornire nuove informazioni sulla patogenesi delle alterazioni immunomediate, associate all'infezione da *L. infantum*. Ulteriori studi sono tuttavia in corso al fine di avvalorare ulteriormente tale ipotesi.

## **BIBLIOGRAFIA**

Abbas, A. K , Lichtman, A.H., Pillai S., 2008 "Immunologia cellulare e molecolare" VI Edizione, Elsevier, Masson. 500-503.

Alexandre-Pires, G., de Brito, M.T., Algueró, C., Martins, C., Rodrigues, O.R., da Fonseca, I.P., Santos-Gomes, G., 2010. "Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs." *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 275- 283.

Belkaid, Y., Tarbell, K., 2009. "Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions." *Annu. Rev. Immunol.* 27, 551–589.

Biller, B.J., Elmslie, R.E., Burnett, R.C., Avery, A.C., Dow, S.W., 2007. "Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer." *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 69-78.

Binhazim A. A., Chapman W. L., Latimer K. S., Styles M., Comer K.,1992 "Canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in two Labrador retrievers". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4: 299-305.

Bonfanti U., Zatelli A., 2004 “Evaluation of proteinuria in leishmaniotic patient”. *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis - Naples, Italy*, 13-17.

Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Magnol., J.P., Saint-Andre, I., Chabanne, L., 1997. “Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis.” *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56, 345-351.

Brandonisio, O., Altamura, M., Carelli, G., 1988. “Lymphocyte functions in *Leishmania infantum* infected dogs. *J. Immunopharmacol.*” 9, 37-40.

Brittingham A., Chen G., McGwire B. S., Chang K. P., Mosser D. M., 1999 “Interaction of *Leishmania gp 63* with cellular receptors for fibronectin”. *Infection and Immunity*, 67, 9: 4477-4484.

Chamizo, C., Moreno, J., Alvar, J., 2005. “Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis.” *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 67-75.

Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A. 1997. “A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*.” *Vet. Rec.*, 141, 539-543.

Ciaramella, P., Corona, M., 2003. “Canine leishmaniasis. Part I. Clinical aspects.” *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 25, 358–369.

Ciaramella, P., Pelagalli, A., Cortese, L., Pero, M.E., Corona, M., Lombardi, P., Avallone, L., Persechino, A., 2005. “Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*.” *Vet. J.* 169, 465-467.

Cortese L., Oliva G., Restucci B., Ciaramella P., Persechino A. 1999 – “Primary hypothyroidism associated with leishmaniasis in a dog.” *JAAHA*, 35, 487-492.

Cortese, L., Sica, M., Piantedosi, D., Ruggiero, G., Pero, M.E., Terrazzano, G., Mastellone, V., Ciaramella, P. 2009. “Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*.” *Vet. Rec.* 164, 778-782.

Cortese, L., Terrazzano, G., Piantedosi, D., Sica, M., Prisco, M., Ruggiero, G., Ciaramella, P., 2011. “Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*.” *Vet. J.* 188, 118–121.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M., L., Knutson, K., L., Chen, L., Zou, W., 2004. “Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.” *Nat. Med.* 10, 942-949.

Day M. J., 2004 “Implications of the immune system during infection by *Leishmania* organism in canine”. *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis - Naples, Italy*, 21-28.

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., 2007 “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.

Ferrer L., Juanola B., Ramos J. A., Ramis A., 1991 “Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs”. *Veterinary Pathology*, 28: 342-343.

Ferrer, L., Solano-Gallego, L., Arboix, M., Arberola, J., 2002. Evaluation of the specific immune response in dogs infected by *Leishmania infantum*. In: Thoday, K.L., Foil, C.S., Bond, R. (eds), *Advances in Veterinary Dermatology*, vol. 4. Blackwell Science, Oxford, pp. 92-99.

Ferrer L., 2004 “Simultaneous presentation of leishmaniasis and other infectious disease: clinical approach and mechanism”. *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis - Naples, Italy*, 37-38.

Font, A., Closa, J.M., Molina, A., Mascort, J., 1993.” Thrombosis and nephrotic syndrome in a dog with visceral leishmaniasis.” *J. of Small Anim. Pract.* 34, 466–470.

Font A., Gines C., Closa J. M., Mascort J., 1994 “Visceral leishmaniasis and disseminated intravascular coagulation in a dog”. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204, 7: 1043-1044.

Gradoni L., “Leishmaniosi canina”. 1989 *Società Culturale Italiana Veterinaria Animali da Compagnia (SCIVAC)*, Cremona: 11.

Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribanez, M.A., Alvar, J., Castillo, J.A., 2000. “Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells”. *Res. Vet. Sci.*, 69, 249-253.

Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribanez, M.A., Castillo, J.A., 2002. “Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis.” *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 13-20.

Houriuchi, Y., Tominaga, M., Ichikawa, M., Yamashita, M., Jikumaru, Y., Nariai, Y., Nakajima, Y., Kuwabara, M., Yukawa, M., 2009. “Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors.” *Microbiol. Immunol.* 53, 468-474.

Huehn, J., Hamann, A., 2005.” Homing to suppress: address codes for Treg migration.” Trends Immunol. 26, 632-636.

Inokuma, H., Ohono, K., Onischi, T., Raoult, D., Brouqui, P., 2001. “Detection of Ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan.” J. Vet. Med. Sci. 63, 815–817.

Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S., Nakae, S., 2011. “Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members.” Immunity. 34, 149-162

Jain N. C., “Essential of Veterinary Hematology”. 1993 *Philadelphia: Lea & Febiger*, 105-133.

Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, N.M., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, G. 1999. “Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study.” J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 35, 376-383.

Koutinas A., Saridomichelakis M. N., 2004 “Clinical aspects of canine leishmaniasis in Greece”. *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis - Naples, Italy*, 45-50.

Littman, D., R., Rudensky, A., Y., 2010. “Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation.” Cell 140, 845–858.

Lopez, R., Lucena, R., Novales, M., Ginel, P.J., Martin, E., Molleda, J.M., 1996. "Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis." *J. Vet. Med. B* 43, 469–474.

Margarito, J.M., Lucena, R., Lopez, R., Molleda, J.M., Martin, E., Ginel, P.J., 1998." Levels of IgM and IgA circulating immune complexes in dogs with leishmaniasis." *J. Vet. Med. B* 45, 263–267.

Maroli M., *Isitututo Superiore di Sanità: comunicazione personale*; 2005.

Miller, M.J., Safrina, O., Parker, I., Cahalan, M.D., 2004. " Imaging the Single Cell Dynamics of CD4 T Cell Activation by Dendritic Cells in Lymph Nodes." *J. Exp. Med.* 200, 847-856.

Miranda, S., Martorell, S., Costa, M., Ferre, L., Ramis, A., 2007. "Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol." *Vet. Parasitol.* 144, 251-260.

Moreno P., 1999 "Evaluation of secondary haemostasis in canine leishmaniasis". *Veterianry Record*, 144: 169-171.

Moreno, J., Nieto, J., Chamizo, C., Gonzalez, F., Blanco, F., Barker, D.C., Alvar, J., 1999. "The immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy." *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 181-195.

Muller, I., Pedrazzini, T., Farrell, J.P., Louis, J., 1989. "T-cell responses and immunity to experimental infection with *Leishmania major*." *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 561–578.

Oliva G., 2004 "Clinical aspects of canine leishmaniasis in Italy". *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis - Naples, Italy*, 63-65.

Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramoccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T., Gradoni, L., 2006. "Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons." *J. Clin. Microbiol.* 44, 1318–1322.

O'Neill, K., Guth, A., Biller, B.J., Elmslie, R.E., Dow, S.W., 2009. "Changes in regulatory T cells in dog with cancer and associations with tumor type." *J. Vet. Intern. Med.* 23, 875-881.

Pampiglione S., Canestri Trotti C., 1990 "Guida allo studio della Parassitologia, II edizione". *Esculapio Editore*, 38-44.

Papadogiannakis, E., Andritsos, G., Kontos, V., Spanakos, G., Koutis, C., Velonakis, E., 2010.

“Determination of CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs with leishmaniosis before and after prolonged allopurinol monotherapy.” The Veterinary Journal 186, 262-263.

Petadines T. A., Koutinas A. F., Mylonakis M. E., Day M. J., Saridomichelakis M. N., Leontides L. S. et al., 2008 “Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*)”. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22: 866-872.

Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bemadina, W., del Real, C., Ruitenber, J., 1994. “Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*.” *Infect. Immun.* 62, 229-235.

Pinelli, E., Gonzalo, R.M., Boog, C.J., Rutten, V.P., Gebhard, D., del Real, G., Ruitenber, E.J., 1995.” *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner.” *Eur. J. Immunol.* 25, 1594-600.

Pinelli, E., Rutten, V.P., Bruysters, M., Moore, P.F., Ruitenber, J., 1999. “ Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. ” *Infect. Immun.* 67, 237-243.

Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti R.C., Guerra, L.L., Carvalho, M.G., Mayrink, W.,

Genaro, O., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., 2006. " Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. " Clin. Exp. Immunol. 146, 303-311.

Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R., 2009. " Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. " Vet. Immunol. Immunopathol. 128, 87-95.

Rissetto, K.C., Rindt, H., Selting, K.A., Villamil, J.A., Henry, C.J., Reinero, C.R., 2010. " Cloning and expression of canine CD25 for validation of anti-human CD25 antibody to compare T regulatory lymphocytes in healthy dogs and dogs with osteosarcoma." Vet. Immunol. Immunopathol. 135, 137 - 145.

Sakaguchi, S., 2005. " Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and nonself. " Nat. Immunol. 6, 345-352.

Santos-Gomes G. M., Campino L., Abranches P., 2000. "Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95 (2): 193-198.

Slappendel R. J., 2002 . "Dog with leishmaniasis". *Tijdschr Diergeneeskd*, 127 (11): 360-361;.

Terrazzano, G., Cortese, L., Piantedosi, D., Zappacosta, S., Di Loria, A., Santoro, D., Ruggiero, G., Ciaramella, P. 2006. " Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. " *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110, 331-337.

Travi B. L., Tabares C. J., Cadena H., Ferro C., Osorio Y., 2001. "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.

van Eys, G.J., Schoone, G.J., Kroon, N.C., Ebeling, S.B., 1992. " Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. " *Molecular and Biochem. Parasitol.* 51, 133–142.