



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

**INFLUENZA DELL'OVARIOISTERECTOMIA
SULLA POPOLAZIONE DEI LINFOCITI T $\gamma\delta$ NEL
SANGUE PERIFERICO NELLA CAGNA**

**INFLUENCE OF OVARIOHYSTERECTOMY ON THE
POPULATION OF LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$ IN PERIPHERAL BLOOD
IN THE BITCH**

Relatore: Chiar.mo Prof. BIGLIARDI Enrico

Correlatore: Chiar.ma Prof.ssa MARCHETTI Cristina

Laureando:

RIZZI Matteo

ANNO ACCADEMICO

2018 / 2019

INDICE

| | |
|---|----|
| Riassunto | 4 |
| Abstract | 6 |
| Introduzione | 8 |
| Anatomia dell'apparato riproduttore | 8 |
| Ciclo estrale nella cagna | 13 |
| Fasi del ciclo estrale | 13 |
| Sviluppo e maturazione linfocitaria | 16 |
| Variazioni delle popolazioni linfocitarie | 24 |
| Autoimmunità | 26 |
| Materiali e Metodi..... | 30 |
| Criteri di inclusione..... | 30 |
| Criteri di esclusione | 31 |
| Raccolta del campione | 32 |
| Marcatura | 36 |
| Risultati | 40 |
| Discussione..... | 44 |
| Bibliografia..... | 46 |

RIASSUNTO

Scopo del presente studio è la valutazione citofluorimetrica dell'influenza che la sterilizzazione ha sulle popolazioni linfocitarie T CD3+ e T $\gamma\delta$ senza considerare razza, età o taglia degli animali.

Innanzitutto si espone un cenno anatomico sull'apparato riproduttore della cagna, successivamente un quadro generale delle conoscenze relative alle popolazioni cellulari in esame dalla genesi fino alla maturazione e al loro ruolo nell'organismo. Viene anche valutato ciò che esiste in bibliografia riguardo queste popolazioni linfocitarie.

In totale è stato raccolto il sangue di ventidue cagne divise in due gruppi valutando se l'animale è stato sottoposto o meno a intervento di ovarioisterectomia. Le popolazioni linfocitarie in esame, come già stato detto, sono i linfociti T con marcatore CD3 e i linfociti T che esprimono il recettore (TCR) $\gamma\delta$.

Il campionamento eseguito ha cercato di ridurre al minimo le influenze genetiche delle varie razze, infatti tutti i soggetti del presente studio sono derivati da incroci.

I "criteri d'inclusione" comprendono animali non di razza pura, di qualsiasi età e taglia mentre sono stati esclusi dallo studio tutti quei soggetti che presentavano condizioni potenzialmente in grado di falsare i risultati ottenuti.

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica e posti a confronto con quelli ottenuti da altri ricercatori sottolineando congruenze e incongruenze nei risultati.

A conclusione del lavoro si ipotizzano applicazioni cliniche di quanto ottenuto e prospettive per nuovi filoni di ricerca.

ABSTRACT

The aim of the present study is the cytofluorimetric evaluation of the influence that sterilization has on the T CD3 + and T $\gamma\delta$ lymphocyte populations without considering race, age or size of the animals.

First of all, an anatomical outline is given on the reproductive apparatus of the bitch, subsequently a general picture of the knowledge concerning the cell populations under examination from genesis to maturation and their role in the organism. A review of the literature regarding these lymphocyte populations is also evaluated.

We collected the blood of twenty-two bitches, divided into two groups, assessing whether or not the animal was subjected to ovariohysterectomy. The lymphocyte populations under examination, as already mentioned, are the T lymphocytes with CD3 marker and the T lymphocytes expressing the receptor (TCR) $\gamma\delta$.

The sampling performed tried to minimize the genetic influences of the various breeds, in fact all the subjects of the present study are derived from crossbreeds.

The "inclusion criteria" include non-pure-bred animals, of any age and size, while all subjects who had conditions potentially capable of distorting the results obtained were excluded from the study.

The data obtained were subjected to statistical analysis and compared with those obtained by other researchers, highlighting congruences and inconsistencies in the results.

At the end of the work we hypothesize clinical applications and perspectives for new lines of research.

INTRODUZIONE

Anatomia dell'apparato riproduttore

Tutta la seguente trattazione anatomica è stata ottenuta dal libro “*Anatomia comparata dei mammiferi domestici*” di Barone Robert, edizione italiana a cura di Bortolami Ruggero, volume 4°.

L'apparato riproduttore femminile si compone fundamentalmente di tre grandi sezioni:

1. ghiandolare: costituita dalle ovaie, che restano in cavità addominale
2. tubulare: presenta tre distretti molto differenti per funzione e conformazione. Le tube uterine captano gli oociti e sono la sede della fecondazione. L'utero riceve l'ovulo fecondato e ne permette l'impianto, protegge il feto e ne permette il sostentamento durante la gravidanza. La vagina è separata dall'utero da un potente restringimento chiamato collo uterino; è in continuità caudalmente con il seno uro-genitale
3. seno uro-genitale: comprende una parte profonda formante il vestibolo della vagina e una regione dell'orificio che costituisce la vulva. Completato dalla vagina, il seno uro-genitale riceve il pene durante la copula e consente il passaggio del feto al momento del parto.

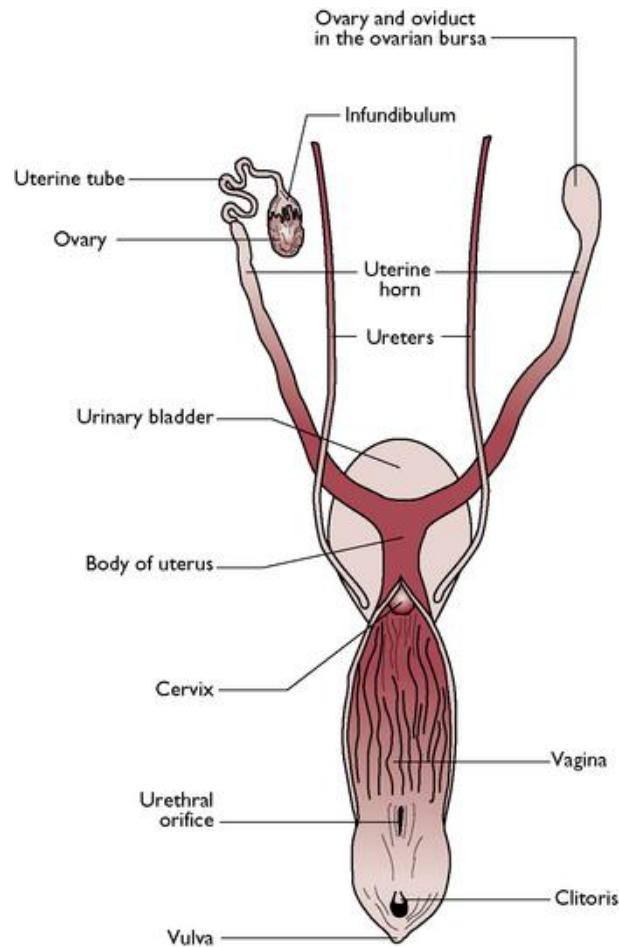


Figura 1: Apparato riproduttore femminile della cagna

Ovaio

Organo pari in cavità addominale, posto caudalmente ai reni. Colore grigio-rosa, quasi liscio nei periodi di riposo funzionale mentre appare bozzellato e a superficie irregolare, per la presenza di numerosi follicoli, nella stagione d'attività. L'ilo è poco pronunciato e non viene oltrepassato dal peritoneo. L'organo è completamente ricoperto dalla borsa ovarica e quasi adeso alla volta addominale. A destra, la gonade è situata dorsalmente al pancreas e alla parte discendente del duodeno; a sinistra è posta dorso-lateralmente al colon discendente e, in genere, è un po' più lontana dalla parete

addominale. Il mesovario prossimale prende il nome di legamento sospenditore dell'ovaio con andamento quasi orizzontale viste le sue inserzioni che arrivano fino al diaframma; il mesovario distale invece è più breve, ricco di cellule muscolari lisce e quasi ridotto ad una semplice aderenza. Il mesosalpinge invece è infiltrato di tessuto adiposo e non consente una agevole visualizzazione dell'ovaio attraverso la borsa ovarica. La fimbria ovarica è breve, larga e ispessita e l'epitelio si estende fino sull'ovaio, dove si unisce per transizione all'epitelio superficiale.

La struttura è caratterizzata da una grande estensione della zona vascolare, circondata da una zona parenchimatosa più sottile. L'arteria ovarica termina triforcandosi poco dorsalmente alla borsa ovarica. Un ramo craniale accompagna il legamento sospenditore dell'ovaio; un ramo uterino, più grosso, si porta caudalmente nel legamento largo. Un ramo intermedio è la continuazione diretta dell'arteria ovarica, raggiunge l'ilo dove ramifica in numerosi piccoli vasi. Il ritorno venoso confluisce assai presto in una vena ovarica.

Tuba uterina

Organo pari, quasi privo di flessuosità, che si estende dall'ovaio al corpo dell'utero. L'infundibolo si apre medialmente all'ovaio e attraverso le fimbrie accoglie gli oociti maturi espulsi dai follicoli. All'ampolla, poi, fa seguito l'istmo che andrà a terminare mediante un piccolo ostio nelle corna dell'utero.

Utero

Organo pari, definito bipartito, con corna strette e lunghe. Le corna hanno un calibro uniforme e si estendono, descrivendo una piccola curvatura a concavità dorsale, dal polo caudale del rene alla faccia dorsale della vescica, cranialmente all'entrata del bacino. La base delle due corna si unisce ad angolo acuto; il corpo e il collo costituiscono un insieme cilindroide di calibro uniforme. La cavità uterina è tappezzata da una mucosa ispessita, compatta, grigio-rossastra che si solleva in pieghe poco elevate, longitudinali, ondulate e irregolari. Il canale cervicale è provvisto di pieghe assai ridotte e collega in direzione ventro-caudale l'utero alla vagina. Di norma, le corna uterine sono applicate contro la parete del fianco. Il collo e il corpo mostrano rapporti con la vescica ventralmente e il colon-retto dorsalmente.

I legamenti larghi sono infarciti di tessuto adiposo, la loro inserzione lombo-sacrale è assai lunga mentre il margine ventrale segue dalla borsa ovarica fino al corpo dell'utero, dove i due legamenti quasi si uniscono. Dalla faccia laterale dei legamenti si staccano i legamenti rotondi, molto robusti. Sempre dalla faccia laterale si staccano anche i legamenti laterali della vescica, che circoscrivono un ampio e profondo fondo cieco.

Il miometrio è relativamente sottile mentre l'endometrio è ispessito con ghiandole poco ramificate. La vascolarizzazione è assicurata dal ramo uterino dell'arteria ovarica e da un ramo dell'arteria vaginale.

Queste arterie formano un'anastomosi alloggiata nel comparto ventrale del legamento largo e da questa si dipartono rami ascendenti e discendenti; questi ultimi anastomizzano e formano una fitta rete vasale uterina. Le vene ricalcano il tragitto delle arterie, confluendo nella vena ovarica e nella vena vaginale.

Vagina

Molto lunga, con mucosa pallida, pieghe numerose e che non scompaiono. Sul pavimento della vagina sbocca l'uretra, determinando un piccolo rilievo a forma di stella.

Vestibolo della vagina

Rivestito da una mucosa più scura rispetto a quella della vagina, con numerosi noduli linfatici che sollevano la superficie. Qui sbocca l'ostio esterno dell'uretra, attorno al quale sono localizzati orifici di numerose ghiandole vestibolari minori. Il bulbo del vestibolo è ben delimitato e presenta un ricco plesso venoso.

Vulva e clitoride

Le labbra sono grosse e si uniscono dorsalmente con una sagoma un po' arrotondata, mentre ventralmente hanno un'unione a punta. La pelle della faccia laterale, di solito pigmentata, è ricoperta di peli non molto lunghi ma fitti. Il clitoride è ben sviluppato ma esile, il suo glande non è facilmente apprezzabile in condizioni di riposo.

Ciclo estrale nella cagna

La cagna è un animale monoestrale stagionale, cioè presenta i cicli estrali due volte l'anno, non è presente una vera e propria stagionalità in quanto possono manifestare l'estro in qualsiasi momento dell'anno. La durata del ciclo è di sei mesi, l'estro varia dai 4 ai 21 giorni con una prevalenza di 9 giorni. L'estro dura anche diversi giorni dopo l'ovulazione nonostante i livelli elevati di progesterone: la luteolisi non avviene anche se l'accoppiamento non è risultato fertile. Questo consentiva in ambiente selvatico la pratica del baliaggio (Noakes D.E. et al., 1938).

La cagna si mantiene fertile per tutta la vita anche se con l'invecchiamento (oltre i 7 anni) si può assistere a un prolungamento della fase interestrale, riduzione della portata delle figliate, aumento dell'incidenza di difetti congeniti e di parti distocici.

Il primo estro compare in relazione allo sviluppo dell'animale, quando cioè avrà raggiunto altezza e peso caratteristici dell'individuo adulto.

Fasi del ciclo estrale

Il ciclo estrale della cagna si compone di: fase follicolare, corrispondente a proestro e estro, fase luteale, cioè metaestro e diestro, e fase di anestro. (Noakes D.E. et al., 1938)

Il proestro ha una durata variabile tra i 3 e i 16 giorni con una media di 9 giorni, nel quale si può riscontrare un livello elevato di estrogeni

prodotti dai follicoli (Onclin et al., 2002); questi ormoni portano a edema della vulva, perdite ematiche, alterazioni del comportamento come irrequietezza e tentativi di monta. Inoltre anche l'ovaio aumenta di dimensioni in questa fase. Il valore medio di estrogeni preovulatori è di 353 ± 140 pmol/L che poi raggiungono il valore di $35,2 \pm 8,8$ pmol/L 80 ore dopo il picco di LH preovulatorio. Il progesterone, presente in quantità ridotta, inizia ad aumentare nelle ultime 48-72 ore del proestro secreto dai follicoli che si luteinizzano, per poi superare i livelli basali ($2,2 \pm 1$ nmol/L) in concomitanza col calo di estrogeni. (de Gier J. et al., 2006). Inoltre in questa fase si può assistere a una proliferazione di dotti e tubuli mammari, ispessimento e allungamento delle corna uterine, edema della cervice, proliferazione dell'epitelio vaginale.

L'estro invece ha una durata media di 9 giorni e inizia con la prima accettazione del maschio; l'edema vulvare è in diminuzione, lo scolo vulvare diventa giallo paglierino e terminano le perdite ematiche. Il livello di estrogeni cala ulteriormente fino a raggiungere livelli inferiori ai 15 pg/ml. L'aumento di progesterone oltre i 5 ng/ml invece determina un picco preovulatorio di ormone follicolo stimolante (FSH) e ormone luteinizzante (LH) da parte dell'ipofisi. L'ovulazione avviene tra 24 e 72 ore dal picco di LH. Il numero di ovulazioni è correlato alla razza e avvengono in un breve lasso di tempo (massimo 96 ore) e anche i follicoli che non vanno incontro a deiezione contengono ovocellule allo stesso stadio di maturazione.

A questa fase segue il diestro che ha una durata variabile: se l'animale è rimasto gravido termina al momento del parto cioè intorno ai 60 giorni, se l'animale non è rimasto gravido perdura per tutta la fase luteinica e quindi per 10-20 giorni in più, e in questa fase è possibile avere una pseudogavidanza. La funzionalità del corpo luteo inizia ad esaurirsi intorno a 25-30 giorni dall'ovulazione, mentre nella cagna gravida verso il 60° giorno. Il progesterone 20-30 giorni dopo l'ovulazione ha un picco, poi rimane stazionario in una fase di plateau per 1-2 settimane per infine abbassarsi fino ai livelli basali determinando la fine del diestro, in concomitanza con un aumento delle prostaglandine e della prolattina.

L'anestro è l'ultima fase del ciclo estrale, si protrae fino al proestro successivo. In questa fase si hanno scariche di LH-FSH con la funzione di provocare ondate follicolari non in grado di produrre strutture luteiniche; intanto l'utero va incontro a fenomeni di involuzione che comportano la *restitutio ad integrum* in 120 giorni nella cagna ciclica e in 140 giorni dopo gravidanza. Durante questa fase sono presenti anche sporadiche scariche di LH che conducono ai due picchi di questo ormone, il primo precede il proestro e il secondo coincide con l'ovulazione (Noakes D.E. et al, 1938).

Sviluppo e maturazione linfocitaria

La specializzazione a produrre le diverse linee cellulari del sistema immunitario viene gradualmente acquisita nel corso di molte transizioni attraverso sottoinsiemi di cellule del midollo osseo fenotipicamente distinguibili.

I progenitori linfoidi possono assumere destini diversi dal programmato e invertire i loro programmi in risposta a specifici segnali ambientali. Le cellule staminali ematopoietiche HSC (haematopoietic stem cells) danno luogo alle differenti linee ematopoietiche. Il primo passo verso la differenziazione genera le due linee di progenitori: CMP (common myeloid progenitors) e CLP (common lymphoid progenitors). Le CLP compiono il loro percorso per differenziarsi nelle diverse linee cellulari fino a ELP (early lymphoid progenitors) all'interno del midollo osseo. Le cellule HSC (cellule multipotenti) sono in grado, per lungo tempo, di autorigenerarsi e maturare, differenziandosi in stadi successivi distinti tra loro dall'espressione di specifici markers.

Le cellule ELP si presume siano cellule strettamente linfoidi; esse sono le cellule più efficienti in termini di capacità di differenziarsi in cellule B e T. Nelle cellule ELP, la potenzialità di produrre cellule non linfoidi diminuisce ma non viene completamente persa, infatti, la loro progenie è in grado di generare, in determinate condizioni, cellule dendritiche.

A guidare la differenziazione tra lo sviluppo di cellule B e cellule T intervengono segnali che fungono da promotori per ogni specifica via di sviluppo; tali segnali sono rappresentati dal NOTCH1 che attiva la linea cellulare T e il PAX5 che determina la differenziazione in linea B. L'equilibrio delle molecole che intervengono durante lo sviluppo e la differenziazione delle linee cellulari T, B, cellule dendritiche e cellule NK, in conseguenza della loro maggiore o minore espressione, determina la predilezione o, al contrario, il blocco di una via a discapito di altre, tale per cui il sistema immunitario, in condizioni fisiologiche, è in grado di dirigere la propria produzione in maniera selettiva in risposta a specifiche condizioni cliniche (Welner R.S. et al. 2008).

I linfociti B maturi abbandonano il midollo osseo per dirigersi verso i linfonodi e la milza, cioè nella condizione necessaria per incontrare eventuali antigeni e generare plasmacellule in grado di elaborare anticorpi con la funzione di eliminare l'antigene. I linfociti B attivati possono conservare memoria immunitaria per risposte successive.

Lo sviluppo intratimico delle cellule T inizia quando i loro precursori provenienti dal fegato fetale e dal midollo osseo migrano nel timo dove trovano il microambiente ideale per espandersi e differenziarsi in cellule T in grado di emigrare verso i linfonodi e i tessuti linfoidei; tale processo avviene per esposizione diretta al microambiente timico seguendo un preciso percorso all'interno delle strutture dell'organo (Love P.E. et al. 2011).

Una volta giunti al timo i progenitori immaturi subiscono una serie di differenziazioni che conducono alla produzione di due diverse linee di cellule T distinte in base all'espressione di recettori (TCR): $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, al quale si aggiungono una catena CD3 (cluster di differenziazione) di tipo γ , una di tipo δ e due di tipo ϵ . Il recettore in entrambi i casi svolge la funzione di riconoscimento dell'antigene. Si tratta di due distinte linee cellulari T che nascono da un comune precursore che non manifesta né l'espressione CD4 né quella CD8 e sono noti come timociti doppio-negativi (DN). Sono state individuate diverse fasi maturative dei timociti da DN1 a DN4 in cui lo stadio DN1 è rappresentato dai timociti più immaturi. Durante lo stadio DN2 e, in parte, DN3, i timociti sono per lo più impegnati nella differenziazione della linea T $\gamma\delta$. Durante la fase DN3 i timociti pre-TCR, costituiti da un recettore delle cellule T a catena β e da un recettore T a catena α , guidano la maturazione da doppio negativi (DN) a singolo positivi (SP). Lo stadio DN3 è, inoltre, un passaggio chiave in cui l'espressione dei pre-TCR o dei TCR $\gamma\delta$ rappresenta il segnale che dirige i timociti verso la proliferazione e la successiva differenziazione (Chen Y. Et al. 2012). I timociti che non subiscono tale attivazione vanno incontro ad apoptosi. Le selezioni β e $\gamma\delta$ si svolgono di pari passo ad un aumento delle dimensioni cellulari. Con la differenziazione della linea $\alpha\beta$ si assiste ad una diminuzione dell'espressione del marker CD25 e alla comparsa dell'espressione di CD4 e CD8 fino a generare cellule "doppio positive" (DP) che costituiscono circa l'80% dei timociti. Le DP subiscono un

riarrangiamento genico che porta all' eterodimero TCR $\alpha\beta$ che genera cellule singolo positive (SP) CD4⁺/CD8⁻ o CD4⁻/CD8⁺. Per contro, la maggior parte delle cellule della linea T $\gamma\delta$ rimane DN e, maturando, perde l'espressione CD24 (Ciofani M. et al. 2010). Le cellule T che hanno completato lo sviluppo timico vengono chiamate "recent thymic emigrants" (RTE) (Figura 2).

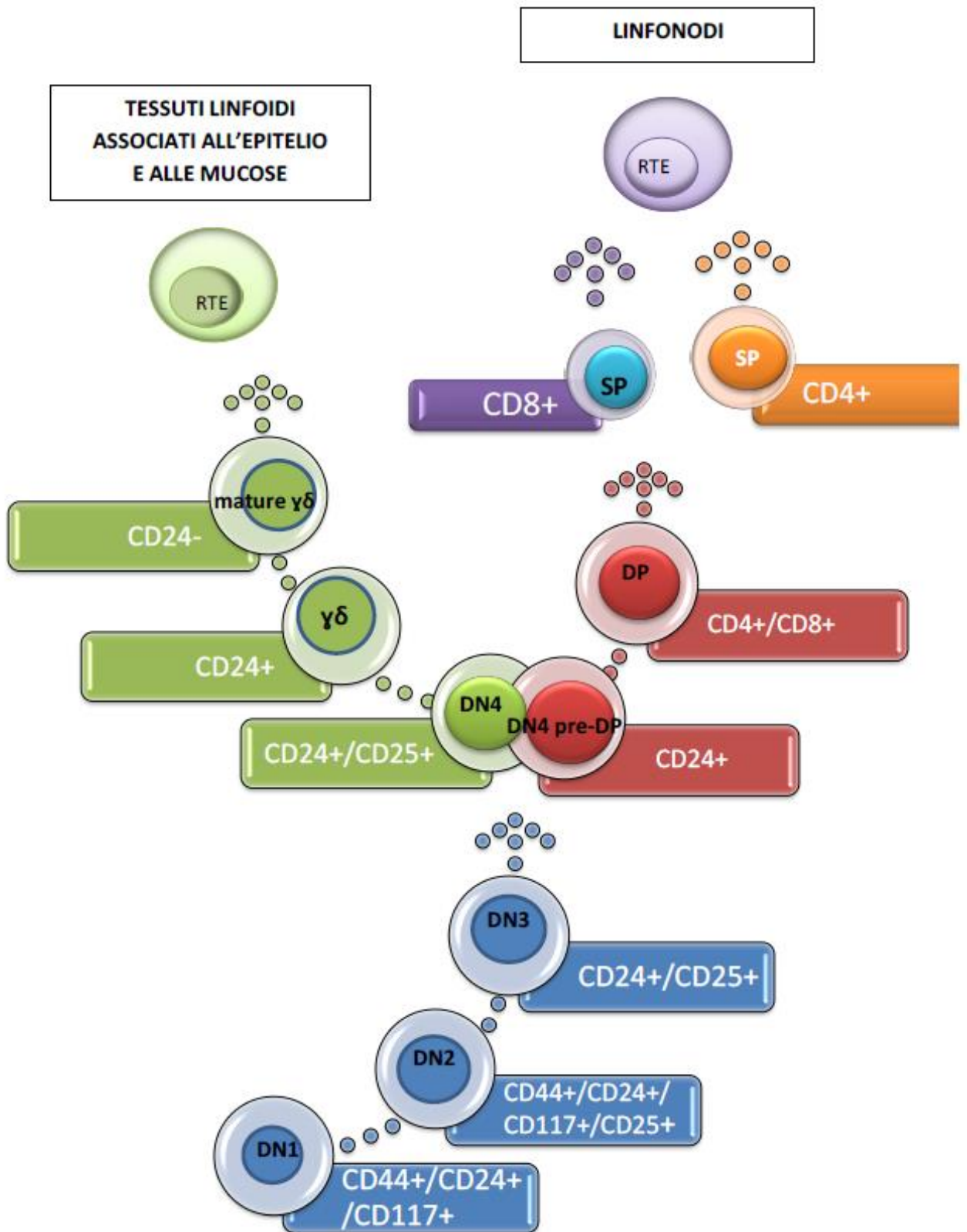


Figura 2: percorso evolutivo dei linfociti T, dal loro ingresso nel microambiente timico fino all'uscita nel circolo ematico

Il mantenimento del numero di linfociti T circolanti viene garantito sia dalla riserva di cellule T circolanti, sia dall'immissione di nuove cellule da parte del timo; queste nuove cellule mantengono un repertorio completo di TCR consentendo una efficace risposta dei linfociti T contro patogeni ed antigeni con cui vengono a contatto; inoltre, nel corso di infezioni virali croniche, rivestono importanti funzioni di clearance virale e risparmio di linfociti CD8+.

Per completare la loro maturazione le cellule RTE devono prendere contatto con organi linfoidi secondari come milza e linfonodi (Fink P.J. et al. 2011).

Una importante caratteristica delle cellule T $\gamma\delta$ è rappresentata dal loro tropismo per l'epitelio cutaneo, il fegato, la mucosa dell'apparato respiratorio, digerente e riproduttivo verso i quali migrano subito dopo aver terminato la maturazione e dove persistono come cellule residenti. I ruoli fisiologici delle cellule T $\gamma\delta$ sono vari e includono l'immunità contro patogeni intra ed extracellulari, la sorveglianza contro i tumori, la modulazione delle risposte immunitarie innate e adattative, il mantenimento dell'integrità epiteliale tramite guarigione delle lesioni e la regolazione delle funzioni fisiologiche degli organi; a seguito del rilevamento di segnali di stress cellulare, le cellule T $\gamma\delta$ promuovono il reclutamento e l'attivazione di granulociti neutrofili, monociti e macrofagi, mentre per quanto concerne l'attivazione del sistema adattativo, tali cellule, dopo aver promosso la maturazione delle cellule dendritiche, stimolano assieme

ad esse la risposta delle cellule B. Le cellule $T\gamma\delta$ contribuiscono, inoltre, all'eliminazione dei patogeni sia direttamente, tramite la produzione di molecole batteriostatiche o litiche, sia indirettamente tramite induzione di funzioni antibatteriche da parte degli altri effettori dell'immunità e delle cellule epiteliali.

Le cellule $T\gamma\delta$ possono produrre varie citochine pro-infiammatorie coinvolte nelle reazioni contro virus (TNF e $IFN\gamma$), batteri e funghi (IL-17) e parassiti extracellulari (IL-4, IL-5 e IL-13). Altri esempi sono il contributo alla riparazione di lesioni corneali, l'intervento in sede polmonare promuovendo il reclutamento di neutrofili e il rinnovo dell'epitelio, infine la transitoria espansione di queste cellule a livello di placenta e ghiandola mammaria in lattazione suggerisce un loro coinvolgimento nel rimodellamento che consegue alle modificazioni a cui questi organi vanno incontro (Bonneville M. et al. 2010).

Le cellule T residenti nell'epitelio dell'intestino sono chiamate "intraepithelial lymphocytes" (IEL) e sono specializzate nel rispondere all'elevato numero di patogeni presenti a livello intestinale. Le IEL possono essere suddivise in due gruppi in base ai meccanismi secondo i quali vengono attivate; il primo gruppo è costituito dalle "natural IELs" che acquisiscono il loro specifico fenotipo durante la maturazione intratimica, dopodiché si posizionano direttamente nell'epitelio intestinale. Il secondo insieme è costituito dalle "induced IELs" che dal timo migrano nei linfonodi

mesenterici e nelle Placche del Peyer, in cui vengono attivate, e da qui si spostano nell' epitelio intestinale. Le funzioni dei "natural IELs" comprendono la conservazione dell'integrità della barriera epiteliale riparando l'epitelio danneggiato da agenti infiammatori o fisici, controllando il turnover e la crescita dell'epitelio, ripulendo dai tessuti necrotici e provvedendo, con la produzione di IgA, alla prima linea di difesa contro l'ingresso di patogeni enterici. Inoltre, le IEL producono anche citochine protettive come "tumor necrosis factor" (TNF) e "gamma interferon" (IFN γ) in risposta alle infiammazioni e ne controllano la produzione da parte di altre cellule infiammatorie, suggerendo quindi che le IEL TCR $\gamma\delta$ siano coinvolte sia nella difesa contro organismi esogeni sia contro i danni causati da una risposta immunitaria esuberante. La differenziazione, l'attivazione e la specializzazione funzionale delle IEL sono quindi regolate dall'interazione con altri tipi cellulari, ma anche influenzate da prodotti dietetici e microbici presenti a livello intestinale. L'interazione tra ambiente e sistema immunitario intestinale contribuisce a mantenere stabile l'equilibrio e la barriera intestinale; tuttavia una eccessiva attivazione delle IEL e la loro ubicazione a ridosso dell'epitelio suggeriscono che queste cellule possono essere coinvolte in risposte immunopatologiche e/o esacerbare patologie infiammatorie alla base di sindromi da malassorbimento come le "inflammatory bowel disease" (IBD) o promuovere lo sviluppo di patologie neoplastiche intestinali. Infatti, in modelli murini in condizioni infiammatorie o durante il riconoscimento di antigeni

estranei con elevata affinità con antigeni self, queste cellule T autoreattive possono condurre a patologie autoimmunitarie (Cheroutre H. et al. 2011).

Variazioni delle popolazioni linfocitarie

Non esiste in letteratura un effettivo consenso riguardo alla modificazione del numero di leucociti nel sangue circolante canino correlato all'età; tuttavia si è concordi sul fatto che le popolazioni B e T subiscano una variazione correlata all'età con un incremento di linfociti T associato a un contemporaneo decremento dei linfociti B. La percentuale di linfociti T risulta essere più bassa nel maschio che nella femmina (Greeley E.H. et al. 2001; Strasser A. et al. 2001; Day M.J. 2010). Inoltre sono state segnalate alterazioni significative in alcune razze canine (Faldyna M. et al. 2001). I linfociti T esprimono sulla loro membrana la molecola CD3 e con l'avanzare dell'età le cellule che presentano questa molecola subiscono una marcata riduzione numerica (Massimino S. et al. 2003; Strasser A. et al. 2000). Su animali sani la letteratura non riporta variazioni correlate all'età a carico dei TCR $\gamma\delta$ (Faldyna M. et al. 2001), mentre altri studi (Marchetti C. 2012) riportano invece che esistono differenze statisticamente significative riconducibili all'età, con una riduzione dei linfociti T $\gamma\delta$ con l'aumentare dell'età, e al peso, con un aumento proporzionale all'incremento di peso.

I linfociti T $\gamma\delta$ subiscono un'alterazione numerica nell'utero affetto da piometra: infatti nell'utero sano il numero di CD8+ è superiore

rispetto ai CD8-; al contrario in caso di piometra il numero di CD8- è nettamente superiore, indicando un aumento di cellule T $\gamma\delta$ nell'utero patologico (Batroškova A. et al. 2012).

Alcuni studi riportano inoltre che la conta dei linfociti T, a livello di endometrio di cagna, varia a seconda della fase del ciclo estrale, in particolare sono maggiormente presenti in anestro e in estro piuttosto che nelle altre fasi del ciclo (Pires M.A. et al. 2015).

Autoimmunità

L'autoimmunità viene definita come una risposta immunitaria specifica nei confronti di antigeni self. Riflette la perdita della tolleranza immunologica nei confronti dei tessuti propri dell'organismo o degli antigeni cellulari ed è caratterizzata da un'attività normale o eccessiva delle cellule effettrici immuni che reagiscono contro antigeni self. Può essere organo-specifica, localizzata o sistemica e può essere mediata sia da anticorpi che da linfociti T autoreattivi (McGavin M.D. et al.).

Le malattie autoimmuni sembrano svilupparsi spontaneamente, e raramente le cause predisponenti sono ovvie. In generale possono risultare da una risposta normale a antigene inusuale, oppure da una risposta abnorme a un antigene normale. Questa seconda categoria sembra essere la più comune.

Nella risposta normale spesso c'è una attivazione immunitaria verso antigeni che precedentemente erano nascosti oppure per crossreattività tra agenti infettanti e normali componenti corporee. Solitamente gli anticorpi prodotti sono IgM o IgG a basso titolo e bassa affinità verso frammenti proteici o proteine danneggiate da ossidazione o da enzimi.

La risposta abnorme, invece, può risultare da una carenza nel normale meccanismo di controllo del sistema immunitario. Non è raro riscontrare autoimmunità di questo tipo anche in tumori linfoidi.

Normalmente i linfociti autoreattivi sono eliminati a livello del timo per apoptosi.

Numerosi fattori possono predisporre a malattie autoimmuni, come ad esempio una predisposizione genetica, data da modificazioni di alcuni geni responsabili di espressione di marker pro-apoptotici, oppure predisposizione di razza, dovuta ad una eccessiva selezione, infatti alcune razze sono più predisposte di altre a sviluppare malattie autoimmuni.

Una malattia autoimmune si manifesta quando i tessuti sono danneggiati da linfociti T o da anticorpi, e questo danno è il risultato di un meccanismo di ipersensibilità (Tizard I.,2012).

Secondo McGavin (2014) e Tizard (2012), l'ipersensibilità può essere distinta in quattro tipi fondamentali:

- Tipo I: allergica. Un antigene che normalmente non dovrebbe causare risposta immunitaria invece la provoca, stimolando una risposta Th2-mediata con formazione di IgE autoimmuni. Questo porta a una risposta di tipo anafilattico con iperproduzione di istamina e altri fattori vasoattivi. Tuttavia questa via di risposta non è molto comune.
- Tipo II: citotossica. Sviluppo di anticorpi diretti contro antigeni presenti sulla superficie cellulare o in un tessuto, che portano alla distruzione della cellula o del tessuto. Sono mediate dalla formazione di IgG e IgM che attivano il complemento, il quale

può mediare la citotossicità attraverso la formazione del complesso di attacco alla membrana, portando a lisi la cellula, o attraverso la fissazione di frammenti del C3 sulla superficie che favorisce la fagocitosi mediante opsonizzazione. La risposta verso componenti cellulari non è così rara.

- Tipo III: da immunocomplessi. Mediata dalla formazione di complessi antigene-anticorpo che attivano il complemento e causano danno tissutale, gli immunocomplessi vengono depositati nei tessuti determinando un danno indiretto, ma attivano anche il complemento richiamando neutrofili e macrofagi, responsabili di ulteriore danno tissutale. Causa di alcune malattie autoimmuni come il Lupus Eritematoso Sistemico o l'artrite reumatoide.
- Tipo IV: ritardata. Risposta cellulo-mediata perché è il risultato dell'interazione tra linfociti T con l'antigene specifico verso i quali sono stati sensibilizzati. La risposta avviene dopo 24-48 ore dall'esposizione e non dipende dalla formazione di anticorpi. Anche questa risposta è abbastanza presente nelle malattie autoimmuni come ad esempio in alcuni tipi di diabete mellito insulino-dipendente.

In uno studio retrospettivo (Sundburg C.R. et al., 2016) è stato analizzato come la sterilizzazione influisca sul sistema immunitario sia nel maschio che nella femmina; in particolare le femmine sterilizzate hanno una maggiore probabilità di sviluppare col tempo delle malattie autoimmuni immunomediate con una prevalenza

elevata soprattutto di anemia emolitica immunomediata (AHIA) e ipoadrenocorticismo (morbo di Addison). Infatti viene evidenziata l'importanza che hanno gli ormoni sessuali sulla funzione immunitaria e suggerisce che potrebbero anche essere implicati nel riconoscimento del self.

MATERIALI E METODI

Per questo studio è stato raccolto il sangue di 22 cagne (*Canis lupus familiaris*) giunti presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico del Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università degli Studi di Parma. Di questi un numero di 12 cagne erano ancora intere, mentre le restanti 10 erano femmine sterilizzate.

Criteri di inclusione

Come punto di partenza è stato fatto firmare ai proprietari dei soggetti da sottoporre a prelievo ematico il consenso informato, in modo tale da assicurarsi di aver spiegato correttamente la procedura da eseguire e il grado di dolore provocato all'animale.

Tutti i soggetti del presente studio sono incroci, che conducono uno stile di vita sano e a stretto contatto con il proprietario. Devono seguire una alimentazione con preparazioni commerciali specifiche per ogni fase della vita e avere orari dei pasti regolari. Il Body Condition Score (BCS) deve essere 4 o 5 su 9, in accordo con le linee guida fornite dalla World Small Animal Veterinary Association (WSAVA).

Il Body Condition Score (BCS) è un valore attribuito allo stato di nutrizione dell'animale. È una scala a 9 punti, in cui i valori 1, 2, 3 sono sotto l'ideale forma fisica; 4 o 5 sono ideali; 6, 7, 8, 9 sono sopra l'ideale. (Freeman et al., 2011)

Il piano vaccinale deve essere regolare, certificato solo da una cartella clinica elettronica, e devono essere passate almeno tre settimane dall'ultimo intervento vaccinale. Il piano da rispettare deve essere conforme con quanto stabilito dalla American Animal Hospital Association (AAHA). (Ford R.B. et al., 2011)

Nei due mesi precedenti il prelievo i soggetti non devono essere stati sottoposti a trattamenti farmacologici (ad eccezione dei trattamenti di profilassi per endo ed ectoparassiti, dal quale devono essere passate però almeno tre settimane), non devono avere subito interventi chirurgici, non devono essere stati sottoposti a radiografie, tomografie assiali computerizzate (TAC), traumi o fattori stressanti.

Endo ed ectoparassiti devono essere assenti.

I soggetti possono presentare patologie parodontali rientranti nelle classi 1, 2 o 3 di una scala a quattro punti (MSD Veterinary Manual; Reiter A.M.). Devono inoltre essere esenti da patologie articolari.

Criteri di esclusione

Sono stati esclusi dalla raccolta dei campioni tutti quei soggetti i cui proprietari non hanno firmato il consenso informato, sono stati esclusi tutti i cani di razza, tutti i soggetti che svolgono meno di due ore di attività fisica al giorno e che non vivono a stretto contatto con il proprietario, che hanno BCS diverso da 4 o 5 su 9.

Tutti i soggetti con una alimentazione di scarsa qualità, irregolare, in competizione con altri animali presenti in casa, sopra o

sottoalimentati; non devono avere assunto alimenti immunostimolanti (come contenenti ioni di zinco).

Non sono stati ammessi allo studio tutti i soggetti con piano vaccinale non in conformità con quanto riportato nelle linee guida, che hanno subito negli ultimi due mesi trattamenti immunostimolanti o immunosoppressivi, che sono stati trattati farmacologicamente oppure sottoposti a procedure chirurgiche, traumi o fattori di stress.

Gli animali non devono essere in uno stato di gravidanza, oppure nel periodo di estro, e non devono essere affetti da qualsiasi stato patologico del tratto riproduttivo.

Endo ed ectoparassiti presenti o terapia da meno di tre settimane esclude i soggetti dallo studio, così come patologie parodontali di stadio 4 o qualsiasi altra malattia infiammatoria o ulcerativa a livello buccale e qualsiasi patologia articolare, sia acuta che cronica.

Raccolta del campione

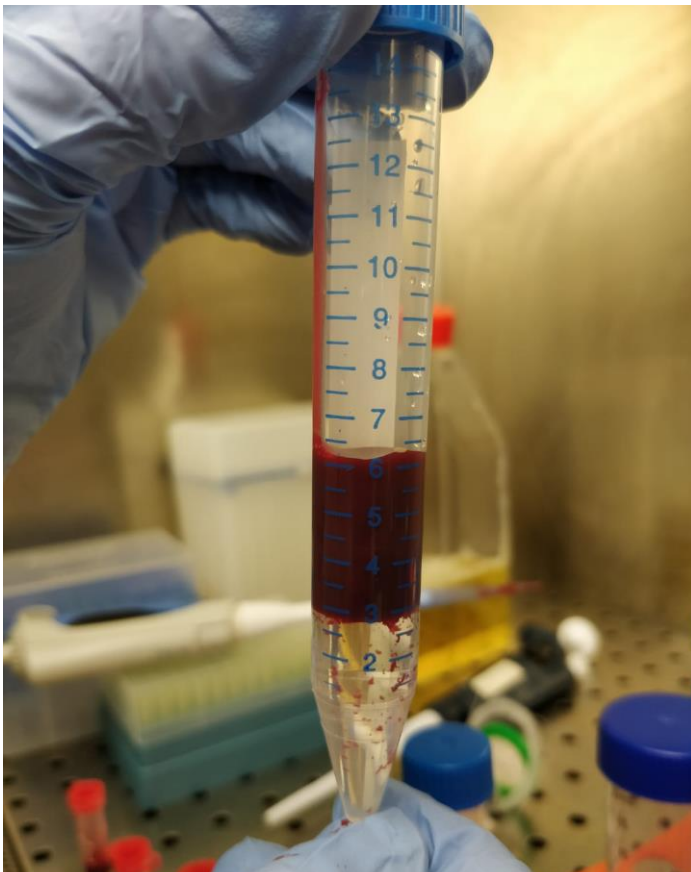
A ciascun cane è stato prelevato un quantitativo di sangue pari a 3 millilitri raccolto in provette con EDTA e conservato per un massimo di sei ore a temperatura ambiente.

Ai soggetti giunti in visita per essere sottoposti a un intervento di ovarioisterectomia è stato inserito un catetere endovenoso come prassi per l'espletamento di procedure anestesologiche di routine; in questo modo si può sostenere che, per ottenere il campione, gli

animali non sono stati sottoposti a procedure in grado di provocare dolore, sofferenza o angoscia.

A tutti gli altri soggetti, invece, è stato effettuato un prelievo ematico in concomitanza con normali prelievi per esami emocromocitometrici o biochimici durante la visita clinica; i proprietari sono stati informati del grado di dolore provocato all'animale dall'inserimento di un ago, conformemente alle buone prassi veterinarie, valutabile come dolore di grado lieve.

La preparazione dei campioni inizia con la stratificazione del sangue intero su una uguale quantità di Histopaque® a temperatura ambiente, facendo attenzione a non creare turbolenze nell' interfaccia (Figura 3). Histopaque® è un mezzo di separazione per gradiente di densità



progettato per separare i linfociti vitali e i monociti da eritrociti, granulociti e cellule morte.

Figura 3: stratificazione del sangue su Histopaque®

La provetta allestita si trasferisce in centrifuga per 30 minuti a 400g, corrispondente a 1300 RPM. Alla fine del tempo di centrifuga si ottiene un campione in cui si può facilmente distinguere l'anello dei linfociti compreso fra un surnatante di colore variabile tra il giallo paglierino ed il rosato più o meno intenso, rappresentato da plasma e piastrine, e due strati sottostanti ben distinti di cui il primo, costituito da Histopaque[®], è poggiato sul pellet di eritrociti, granulociti e cellule morte (Figura 4).

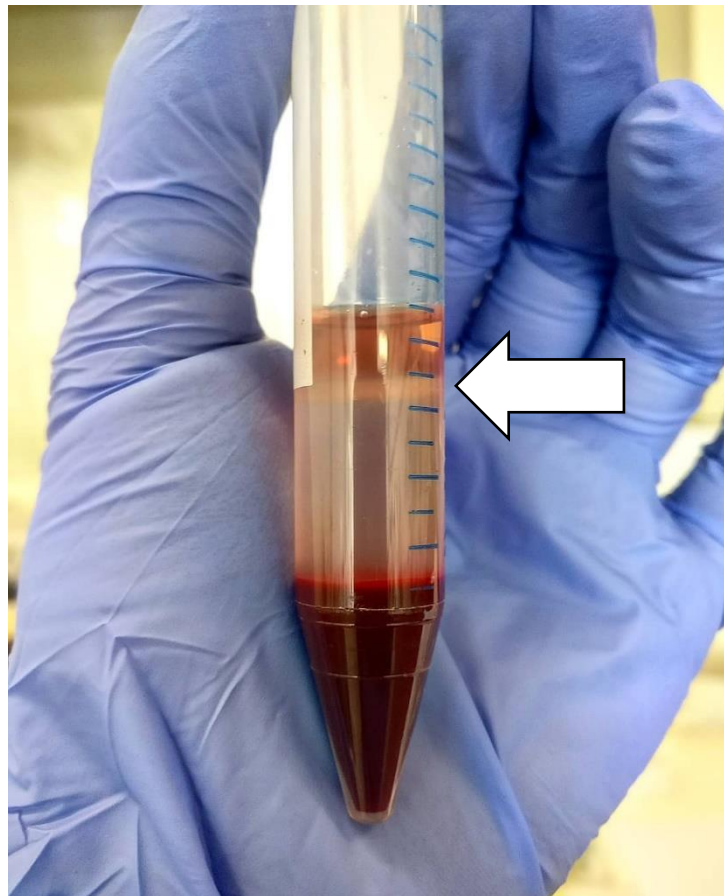


Figura 4: stratificazione dopo centrifuga; la freccia bianca indica lo strato di linfociti

Con la pipettatrice da 1000 μ l si preleva l'anello di linfociti facendo attenzione a non raccogliere gli strati adiacenti per avere un campione rappresentato prevalentemente da linfociti. Le cellule, trasferite in una nuova provetta, devono essere risospese in 3 ml di Roswell Park Memorial Institute (RPMI)[®] e poste in centrifuga a 1000 RPM per 10 minuti. Al termine di questo processo sul fondo della provetta si sarà formato un pellet di cellule (Figura 5).

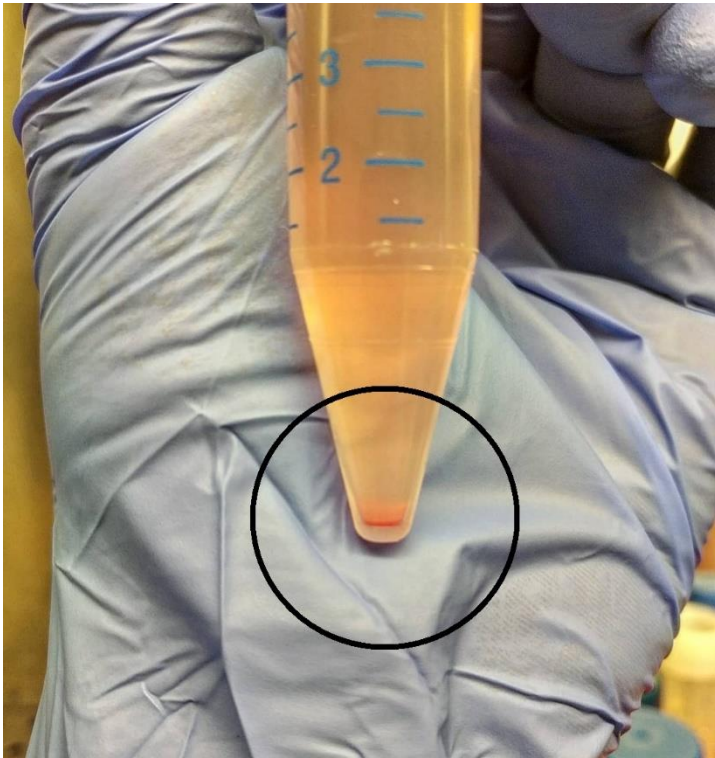


Figura 5: pellet sedimentato dopo centrifuga, evidenziato dal cerchio nero

Il surnatante deve essere eliminato, dopodiché le cellule devono essere risospese in 3 ml di RPMI[®] e poste nuovamente in centrifuga a 1000 RPM per 10 minuti. Eliminato di nuovo il surnatante le cellule sono state risospese in 1 ml di crioprotettore (Figura 6) e portate a

una temperatura di -80°C . Raggiunta questa temperatura le provette sono state poste in azoto liquido in attesa della marcatura.

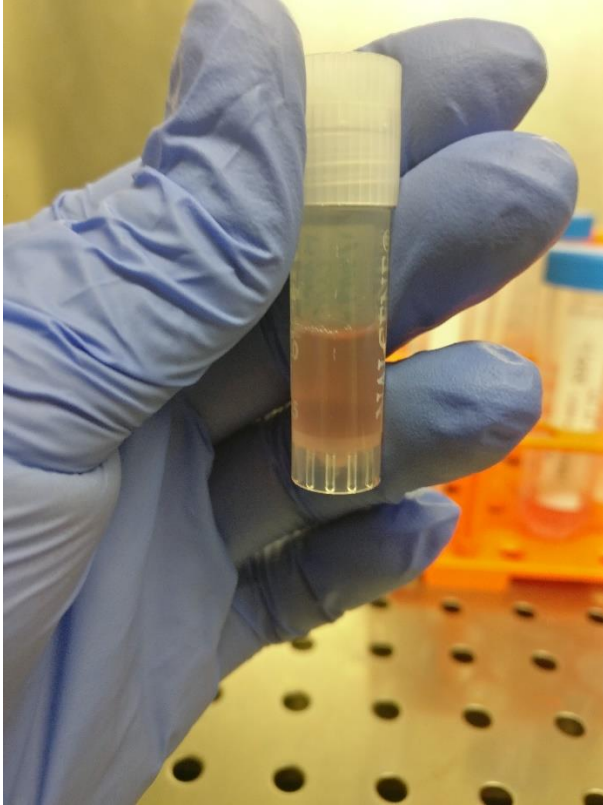


Figura 6: campione pronto al congelamento in azoto liquido

Marcatura

Una volta scongelate le provette, il pellet di linfociti viene risospeso nella “soluzione di marcatura” allestita diluendo nel PBS-EDTA 5% una aliquota di Fetal Bovine Serum (FBS) nella proporzione del 5%. Si calcola, a questo punto, la quantità totale della soluzione considerando che in ogni tubo da marcatura si depongono $100\mu\text{l}$ di miscela di linfociti sospesi nella soluzione di marcatura; al numero totale di tubi ne va aggiunto uno per il controllo non marcato.

Una volta distribuita la soluzione nei tubi, si aggiunge l'anticorpo nella quantità elencata in Tabella 1.

| Tubo | Anticorpi | Fluorocromo | Molecole | Isotype | Clone | µl | Fornitore |
|-------------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------------|-----------|------------------------------|
| 1 | Controllo non marcato | null | | | | | |
| 2 | Mouse anti-dog CD3 | FITC | CD3 | IgG1 | CA17.2°12 | 5 | ABD serotec (Space Import) |
| 3 | TCR $\gamma\delta$ | null | TCR $\gamma\delta$ | IgG2a | CA20.8H1 | 5 | Leucocyte Antigen Laboratory |
| | Goat anti-mouse IgG2A | PE | | IgG2A | | 5 (dil) | Invitrogen |

Tabella 1: Anticorpi utilizzati nell' esperimento

In un primo passaggio si aggiungono gli anticorpi già coniugati con i relativi fluorocromi nei tubi 1 e 2, e l'anticorpo per i TCR $\gamma\delta$ nel tubo 3, avendo cura di mantenere i tubi allestiti su un substrato freddo; i tubi così preparati vengono riposti al buio e ad una temperatura di 4°C per 30 minuti. Trascorso questo tempo si risospende il contenuto di ogni tubo in 4 ml di soluzione per marcatura e si pone in centrifuga a 300 RPM per 10 minuti; eliminato poi il surnatante si aggiungono 400 µl di soluzione per marcatura ai tubi 1 e 2, cioè quelli già coniugati con il fluorocromo e si procede alla lettura al citofluorimetro. Nel frattempo, nel tubo 3, si aggiunge l'anticorpo

secondario (Goat anti-mouse IgG2a Pe - Invitrogen) che si lega ai siti di legame occupati in precedenza dall'anticorpo primario. Anche questo tubo viene lasciato a una temperatura di 4°C e al buio per 30 minuti, trascorsi i quali si procede con un lavaggio con 4 ml di soluzione per marcatura, centrifuga e eliminazione del surnatante. A questo punto si risospende il pellet in 400 µl di soluzione per marcatura e si può procedere alla lettura al citofluorimetro.

La lettura è stata effettuata con lo strumento "FC 500" della Beckam Coulter valutando, per ogni campione, 12000 eventi e l'analisi dei risultati è stata eseguita con il programma "Expo ADC Software".

Per indagare queste popolazioni linfocitarie sono stati utilizzati anticorpi per citometria a flusso specifici per la specie canina, Mouse anti-dog CD3:FITC prodotto da AbD Serotec e distribuito da Space Import Export S.r.l per la marcatura dei CD3, e l'antigene canino TCR $\gamma\delta$ clone CA20.8H1, isotype IgG2a prodotto e distribuito da "Leucocyte Antigen Laboratory (LABL)" del Professor Peter F. Moore dell'università di Davis in California.

L'analisi statistica è stata eseguita con l'intento di capire se fossero osservabili delle differenze statisticamente significative della popolazione linfocitaria T CD3+ e $\gamma\delta$ nelle popolazioni di femmine intere e femmine sterilizzate.

I dati ottenuti sono stati poi analizzati secondo il Post-hoc Power, è stata valutata la forza statistica dei dati raccolti, cioè se il campione raccolto è rappresentativo o meno della popolazione totale. Il valore ottenuto è di 95,6%, ciò sta a significare che il campione è rappresentativo, in quanto è considerato tale con un valore $\geq 80\%$.

Inoltre è stato valutato se ci fossero dei dati che si discostano troppo dagli altri ottenuti. Questa analisi ha rivelato che non ci sono *outliers*, cioè non ci sono valori che possono andare ad alterare i risultati ottenuti o che si discostano troppo dagli stessi.

RISULTATI

Come già descritto nella sezione “Materiali e Metodi” per questo studio sono stati presi in considerazione 22 soggetti di sesso femminile, ai quali è stato prelevato un quantitativo di sangue pari a 3 ml secondo le buone prassi veterinarie. Questi 22 soggetti sono stati divisi in due gruppi: femmine intere (12 soggetti) e femmine sterilizzate (10 soggetti).

In questo studio è stata analizzata la componente cellulare di linfociti CD3+ e di linfociti T $\gamma\delta$ nel sangue periferico di cagne intere e cagne sterilizzate. In Figura 7 sono esposti i valori medi delle popolazioni linfocitarie.

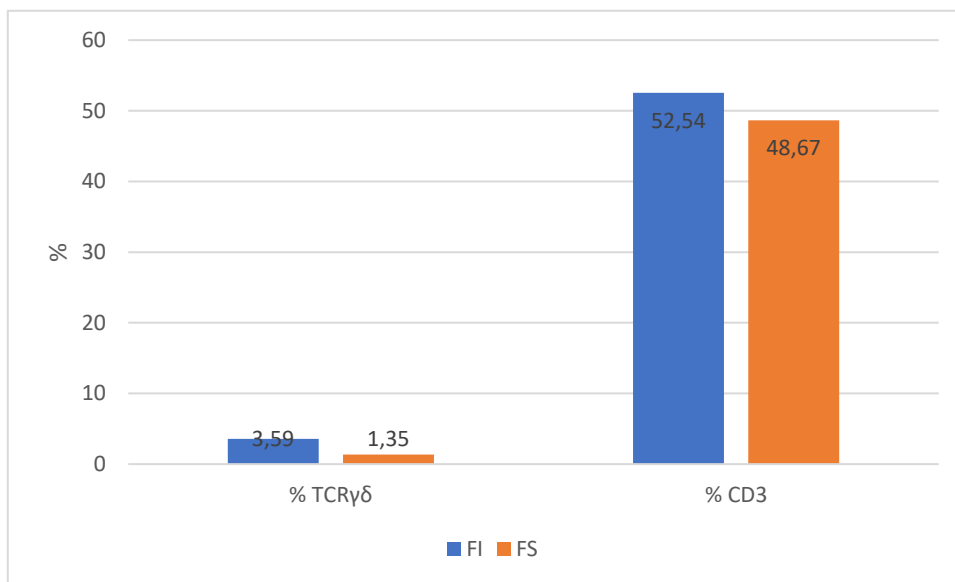


Figura 7: elaborazione grafica delle percentuali di linfociti CD3+ e linfociti T $\gamma\delta$ nel sangue periferico

Dal grafico si evince che la media delle popolazioni linfocitarie CD3+ è più elevata nelle femmine intere piuttosto che nelle femmine sterilizzate; la stessa cosa si può dire per quanto riguarda i linfociti T $\gamma\delta$ che subiscono un calo importante dopo la sterilizzazione.

I linfociti T CD3+ dimostrano la tendenza a diminuire dopo l'intervento di sterilizzazione in maniera non statisticamente significativa (0,7 con $p < 0.05$). In Figura 8 sono stati inseriti i valori di tutti i campioni.

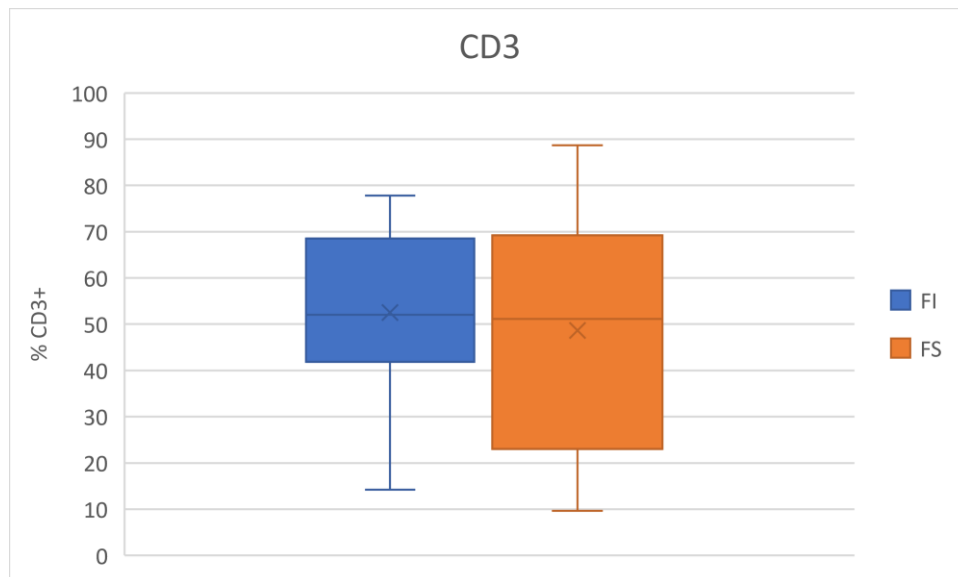


Figura 8: valori dei linfociti T CD3 in femmine intere e sterilizzate

Si è concordi sul fatto che i linfociti T CD3+ subiscano una diminuzione numerica con l'avanzare dell'età dell'animale (Massimino S. et al. 2003; Strasser A. et al. 2000); tuttavia non si è ancora giunti a un effettivo consenso per quanto riguarda la modificazione di questa popolazione cellulare dopo la sterilizzazione.

I linfociti T che esprimono recettore (TCR) $\gamma\delta$ dimostrano anch'essi tendenza a diminuire dopo l'intervento di sterilizzazione, in maniera statisticamente significativa (0,002 con $p < 0,05$). In Figura 9 sono stati inseriti tutti i valori dei campioni.

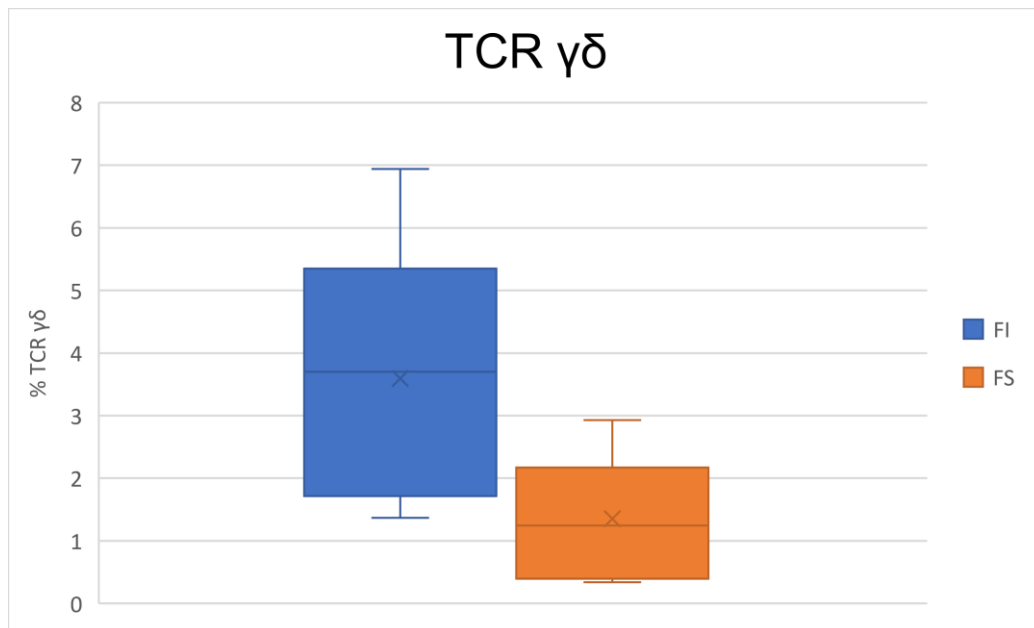


Figura 9: valori dei linfociti T $\gamma\delta$ in femmine intere e sterilizzate

Riguardo all'età, negli animali sani non sono state riportate differenze significative della popolazione linfocitaria (Faldyna M. et al. 2001), anche se studi successivi (Marchetti C. 2012) hanno dimostrato che esistono variazioni statisticamente importanti riconducibili sia all'età che alla taglia, in quanto si osserva una diminuzione con l'avanzare dell'età e invece un aumento con l'aumentare del peso dell'animale.

DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo studio è stato quello di verificare se le popolazioni linfocitarie prese in esame subissero variazioni percentuali nella cagna dopo la sterilizzazione, senza considerare differenze di età o di taglia o di razza.

In letteratura si trova ben poco sulle alterazioni quantitative di linfociti T CD3 e $\gamma\delta$ dopo la sterilizzazione della cagna.

I dati ottenuti dimostrano che, tra cagne intere e cagne sterilizzate, non si riscontra una differenza statisticamente significativa riguardo alla riduzione dei CD3 nel sangue periferico.

Per quanto riguarda i linfociti T $\gamma\delta$, invece, la differenza nel sangue periferico è statisticamente significativa. La letteratura non è concorde sulla modificazione quantitativa di questa popolazione linfocitaria con il variare dell'età (Faldyna M. et al. 2001; Marchetti C. 2012) e con il variare anche del peso dell'animale, predisponendo le basi per un futuro studio.

È anche da tenere in considerazione, però, che questo tipo di linfociti è soprattutto associato ad una immunità locale, in particolar modo a livello mucosale di intestino, tratto riproduttivo e apparato respiratorio, oltre che a livello epiteliale cutaneo.

Questo suggerisce la possibilità di effettuare dei futuri studi valutando, appunto, la prevalenza di questi linfociti nei tessuti,

rapportandola magari con l'età o la taglia o il sesso dell'animale, o magari anche la loro alterazione in tessuti patologici rispetto ai tessuti sani.

Dai dati ottenuti si evince che, in linea di massima, le popolazioni linfocitarie subiscono una riduzione dopo la sterilizzazione, quindi questa pratica potrebbe essere usata come ultima risorsa anche nel caso di alcune patologie autoimmuni. Ciò però è in contrasto con quanto riportato da Sundburg C.R. et al., che invece indica come la sterilizzazione porti ad una aumentata incidenza di patologie autoimmuni. Anche questo potrebbe essere uno spunto per futuri studi valutando come l'incidenza di patologie immunomediate potrebbe variare con la sterilizzazione, il sesso, l'età o la taglia dell'animale.

In conclusione si può affermare che la sterilizzazione porta a modificazioni non solo riguardo lo stato riproduttivo e ormonale degli animali, ma anche ad una alterazione delle popolazioni linfocitarie nel sangue periferico.

Tuttavia molte domande rimangono aperte riguardo a queste popolazioni, soprattutto per quanto riguarda i linfociti T $\gamma\delta$, gettando le basi per innumerevoli studi successivi atti a comprendere meglio la loro natura e la loro implicazione negli stati fisiologici e patologici.

BIBLIOGRAFIA

1. Barone R. , 1990 *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*
Seconda ristampa della prima edizione, 2009, Edagricole; Vol. 4°,
348-355
2. Batroskova A., Turanek-Knotigova P., Matiasovic J., Oreskovic
Z., Vicenova M., Stephanova H., Ondrackova P., Vitasek R., Levá
L., Moore P.F., Faldyna M. 2012 *$\gamma\delta$ T lymphocytes are recruited
into the inflamed uterus of bitches suffering from pyometra.*
Veterinary Journal 194(3): 303-308
3. Bonneville M., O'brien R.L., Born W.K. 2010 *$\gamma\delta$ T cells effector
functions: a blend of innate programming and acquired plasticity.*
Nature Reviews Immunology 10(7): 467-478
4. Chen Y, Ci X., Gorentla B., Sullivan S.A., Stone J.C., Zhang W.,
Pereira P., Lu J., Zhong X.P. 2012 *Differential requirement of
RasGRP1 for $\gamma\delta$ T cell development and activation.* Journal of
Immunology 189(1): 61-71

5. Cheroutre H., Lambolez F., Mucida D. 2011 *The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes*. Nature Reviews Immunology 11(7): 445-456
6. Ciofani M., Zúñiga-Pflücker J.C. 2010 *Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development*. Nature Reviews Immunology 10(9): 657-663
7. Day M.J. 2010 *Ageing, Immunosenescence And Inflammaging In The Dog And Cat*. Journal of Comparative Pathology 142(1): S60-69
8. de Gier J., Kooistra H.S., Djajadiningrat-Laanen S.C., Dieleman S.J., Okkens A.C. 2006 *Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17 β , progesterone, prolactin, and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch*. Theriogenology 65, 1346-1359

9. Faldyna M., Levá L., Knötigová P., Toman M. 2001 *Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82(1-2): 23-37

10. Fink P.J., Hendricks D.W. 2011 *Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality*. *Nature Reviews Immunology* 11(8): 544-549

11. Freeman L., Becvarova I., Cave N., MacKay C., Nguyen P., Rama B., Takashima G., Tiffin R., Tsjimoto H., Beukelen van P., 2011 *WSAVA Nutritional Assessment guidelines*, *J. Small Animal Practice* 52; 385-396

12. Ford R.B., Larson L.J., Schultz R.D., Welborn L.V., 2011 *The American Animal Hospital Association (AAHA), Canine Vaccination Guidelines*.
https://www.aaha.org/globalassets/02-guidelines/canine-vaccination/vaccination_recommendation_for_general_practice_table.pdf

13. Greeley E.H., Ballam J.M., Harrison J.M., Kealy R.D., Lawler D.F., Segre M. 2001 *The influence of age dogs and gender on the immune system: a longitudinal study in Labrador Retrievers dogs*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82(1-2): 57-71
14. Love P.E., Bhandoola A. 2011 *Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration*. *Nature Reviews Immunology* 11(7):469-477
15. Marchetti C. 2012 *Studio immunofenotipico delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico di cani a diverse età*. Tesi di dottorato in Immunologia, Immunopatologia Sperimentale e Comparata, XXV ciclo
16. Massimino S., Kearns R.J., Loos K.M., Burr J., Park J.S., Chew B., Adams S., Hayek M.G. 2003 *Effects of age and dietary β -carotene on immunological variables in dogs*. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17(6): 835-842
17. McGavin M.D., Zachary J.F., 2006 *Patologia generale veterinaria*, Quarta edizione EDRA, ristampa 2014; 210-227

18. Noakes D.E., Parkinson T.J., England G.C., 1938 *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, decima edizione Elsevier, 2019; 2-7, 27-31
19. Onclin K., Murphy B., Verstegen J.P. 2002 *Comparison of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches*. *Theiogenology* 57, 1957-1972
20. Pires M.A., Payan-Carreira R. 2015 *Resident macrophages and lymphocytes in the canine endometrium*. *Reproduction in Domestic Animals* 50(5): 740-749
21. Reiter A.M., *Periodontal disease in small animals*, MSD Veterinary Manual.
<https://www.msdtvetmanual.com/digestive-system/dentistry/periodontal-disease-in-small-animals>
22. Strasser A., Teltscher A., May B., Sanders C., Niedermüller H. 2000 *Age-associated changes in the immune system of German Shepherd dogs*. *Journal of Veterinary Medicine series A* 47(3): 181-192

23. Sundburg C.R., Belanger J.M., Bannasch D.L., Famula T.R., Oberbauer A.M., 2016 *Gonadectomy effects on the risk of immune disorders in the dog: a retrospective study*. BMC Veterinary Research 12, 278

24. Tizard I.R., Schubot R.M., 1977 *Veterinary Immunology*, Nona edizione Elsevier, ristampa 2012; 401-407

25. Welner R. S., Pelayo R., Kincade P.W. 2008 *Evolving views on the genealogy of B cells*. Nature Reviews Immunology 8(2):95-106