

GLI EOSINOFILI DEL GATTO

THE CAT EOSINOPHIL

ALESSANDRA FONDATI

Ambulatorio Veterinario Prati - Viale delle Milizie 1/A - 00192 Roma

Riassunto

Studi recenti hanno ampliato le conoscenze sulla morfologia, i meccanismi di degranolazione e le attività biologiche degli eosinofili del gatto. Con indagini ultrastrutturali è stata confermata la presenza negli eosinofili felini di granuli specifici bicompartimentali (*core* e *matrix*) ed è stata caratterizzata la morfologia degli organelli vescicolo-tubulari (VTO). Sempre in studi ultrastrutturali è stato osservato che gli eosinofili felini rilasciano il contenuto dei granuli attraverso due meccanismi, la cosiddetta degranolazione piecemeal (PMD) e la citolisi, o degranolazione citotossica. Il primo meccanismo è stato documentato sia in eosinofili circolanti che tissutali mentre il secondo solo in eosinofili tissutali, in corso di malattie infiammatorie eosinofile cutanee. È stato dimostrato inoltre, attraverso studi biochimici, che i granuli degli eosinofili del gatto contengono almeno tre delle proteine descritte in altre specie, una proteina basica maggiore (MBP), una ribonucleasi ed una perossidasi e che queste proteine possiedono attività battericida. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per delucidare quegli aspetti che restano ancora poco conosciuti, tra cui gli stimoli per il *recruitment* tissutale degli eosinofili felini, nonché i ruoli fisiologici e patologici di queste cellule.

Summary

Our current knowledge on the morphology, degranulation mechanisms and biological activities of the cat eosinophil has been recently increased. Ultrastructural studies have confirmed the presence in feline eosinophils of bicompartmental (core and matrix) specific granules and have characterized the morphology of vesiculo-tubular organelles (VTO). Furthermore, in ultrastructural studies it has been observed that cat eosinophils release their granule contents through two mechanisms, the so called piecemeal degranulation (PMD) and cytolysis, or cytotoxic degranulation. The first degranulation pattern has been documented both in circulating and tissue eosinophils, whereas the second one only in tissue eosinophils, in inflammatory cutaneous eosinophilic diseases. In addition, it has been demonstrated, in biochemical studies, that cat eosinophils possess at least three of the proteins present in eosinophils of other species, a major basic protein (MBP), a ribonuclease and a peroxidase and that these proteins possess bactericidal activity. Nevertheless, further studies are needed to elucidate those aspects still unknown, stimuli for tissue recruitment of cat eosinophils and physiologic and pathologic roles of these cells, among others.

INTRODUZIONE

Nel 1879, il medico tedesco Paul Ehrlich definì eosinofili quelle cellule ematiche i cui granuli intracitoplasmatici mostravano intensa affinità per il colorante acido eosina¹. Tuttavia, è probabile che gli eosinofili siano stati osservati per la prima volta, in preparati non colorati, da Wharton Jones nel 1846¹.

Dopo circa un secolo e mezzo, nonostante gli eosinofili siano stati, e siano tuttora, oggetto di ricerca, la loro funzione, come cellule del sistema immunitario dei mammiferi, resta controversa. Lo dimostra l'altalenarsi dell'opinione della comunità scientifica, negli ultimi 50-60 anni, sui loro ruoli positivi e negativi.

Fino a 30-40 anni fa gli eosinofili erano considerati cellule benefiche per l'organismo, importanti sia per la difesa

nei confronti di parassiti elminti che per la loro attività antinfiammatoria, attribuita all'effetto neutralizzante sui mediatori dell'infiammazione liberati dai mastociti^{2,3}.

Successivamente, l'opinione scientifica nei confronti degli eosinofili ha subito profondi cambiamenti legati, più o meno direttamente, al progresso socio-economico del mondo occidentale. La progressiva riduzione delle elmintiasi e il parallelo aumento delle malattie allergiche hanno determinato uno spostamento dell'attenzione del mondo scientifico verso gli effetti negativi degli eosinofili nelle reazioni di ipersensibilità, in particolare verso il loro ruolo causale nell'induzione del danno bronchiale nell'asma⁴.

Da pochi anni la situazione è nuovamente cambiata ed i ruoli negativi degli eosinofili nelle reazioni di ipersensibilità, ed in particolare nell'asma, sono stati ridimensionati. È stato osservato infatti che la terapia con anticorpi monoclonali anti-interleuchina (IL)-5, la citochina più importante per la produzione e l'attivazione degli eosinofili, mentre induceva una riduzione dell'eosinofilia, non determinava un miglioramento dei problemi respiratori in pa-

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione l'1/09/2006 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 10/10/2006”.

zienti asmatici, mettendo quindi in dubbio il ruolo di queste cellule nella patogenesi dell'asma⁵. Al momento attuale il ruolo principale degli eosinofili nell'asma viene ricondotto all'azione favorente la deposizione di proteine della matrice extracellulare^{6,7,8}.

Tuttavia, dato che causare danni all'organismo non può essere la *raison d'être* per nessuna cellula del sistema immunitario innato, a cui appartengono anche gli eosinofili, recentemente la ricerca si è rivolta allo studio degli effetti protettivi di queste cellule nei confronti di infezioni sostenute da alcuni virus a RNA⁹, nonché allo studio della loro possibile azione anti-tumorale¹⁰ e della loro partecipazione ai processi di cicatrizzazione¹¹.

Inoltre, è bene sottolineare che nei paesi cosiddetti "sottosviluppati", l'attività protettiva degli eosinofili nei confronti di parassiti elminti resta tuttora probabilmente la più importante, specie in infestazioni caratterizzate da migrazione di larve nei tessuti^{12,13}. Lo stesso vale in ambito zootecnico, in cui l'azione protettiva di queste cellule in corso di elmintiasi continua ad essere oggetto di studio, specie negli ovini^{14,15}.

Mentre gli studi sugli eosinofili umani sono in continuo aumento, non è possibile dire altrettanto per gli eosinofili degli animali da compagnia, in cui per altro le malattie infiammatorie eosinofile rappresentano un problema importante e di difficile gestione terapeutica, soprattutto nel gatto, una specie in cui frequentemente gli eosinofili partecipano ai processi infiammatori. Recentemente, sono stati studiati alcuni aspetti morfologici e biologici degli eosinofili del gatto che verranno riportati in questa rassegna.

MORFOLOGIA

Gli eosinofili maturi circolanti del gatto hanno un diametro di 6-9 μm , un nucleo bilobato e numerosi granuli citoplasmatici acidofili, di forma tondeggianti e/o allungata¹⁶. Studi ultrastrutturali hanno evidenziato che gli eosinofili del gatto hanno proiezioni citoplasmatiche sulla superficie e che contengono alcuni degli organelli intracitoplasmatici, i granuli specifici e gli organelli vescicolo-tubulari (VTO), descritti anche negli eosinofili di altre specie^{17,18,19}.

I granuli specifici, detti anche secondari, corrispondono ai granuli acidofili visibili al microscopio ottico. Sono circondati da una membrana e contengono, come in altre specie, inclusa l'umana, due compartimenti distinti, il *core*, osmiodensso e composto da strati lamellari concentrici, e la *matrix*, meno densa. A differenza di quanto accade negli eosinofili umani, in cui il *core* assume una posizione centrale nel granulo, nel gatto è periferico¹⁹. All'interno dei granuli, la forma, le dimensioni, la densità e il numero dei *cores* sono variabili¹⁹. Negli eosinofili circolanti di gatto, in sezioni trasversali, i granuli specifici sono circa 20 per cellula, misurano 0,5-0,7 μm , ed hanno forma estremamente variabile, da rotonda ad allungata a romboide¹⁹. I granuli specifici contengono quattro proteine basiche, una proteina basica maggiore (MBP), una perossidasi (EPO), una neurotossina (EDN) e una proteina cationica (ECP), specifiche degli eosinofili, a cui si deve l'affinità dei granuli per i coloranti acidi¹. Recentemente, in base all'immunolocalizzazione nella membrana dei granuli specifici degli eosinofili umani di alcune *Lysosome-Associated Membrane Proteins* (LAMPs), specifiche della

membrana lisosomiale, e al fatto che questi granuli contengono enzimi idrolitici, è stato ipotizzato che potrebbero essere considerati, in condizioni particolari, come lisosomi²⁰.

I VTO, definiti un tempo microgranuli, comprendono piccole vescicole e tubuli rivestiti da una membrana e possono assumere una forma a mazza di tamburo, a C o ad anello^{17,19}. Negli eosinofili umani circolanti, in sezioni trasversali, sono circa 160 per cellula²¹. Si pensa che i VTO si formino per endocitosi, infatti contengono albumina²², ed è possibile inoltre che, dato che esprimono CD11b (catena α di un'integrina β_2), possano rappresentare un compartimento cellulare di riserva di recettori da trasferire poi sulla membrana degli eosinofili una volta attivati²¹. È probabile che intervengano in certi processi di degranulazione, durante i quali il loro numero aumenta^{21,23} (Figg. 1, 2).

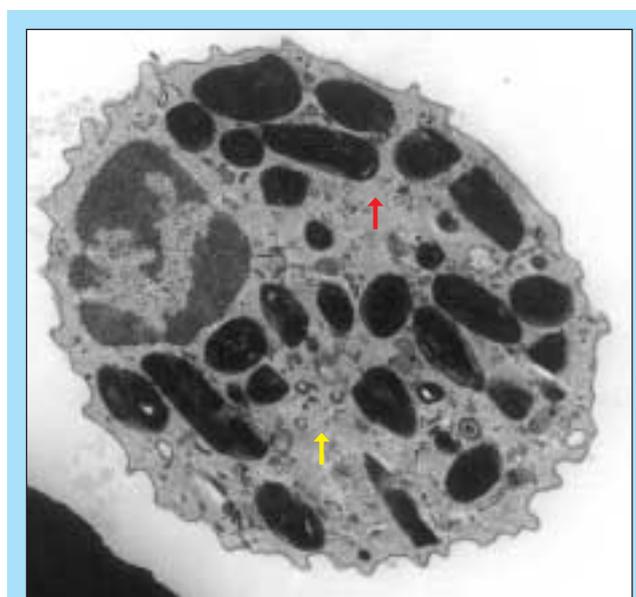


FIGURA 1 - Immagine ultrastrutturale di un eosinofilo circolante di gatto. Si osservano le digitazioni citoplasmatiche periferiche, i granuli specifici con cores osmiodensi e polimorfi (freccia rossa) e numerosi organelli vescicolo-tubulari (VTO) (freccia gialla), altrettanto polimorfi (post-fissazione in osmio con aggiunta di ferrocianuro di potassio 1.5%).

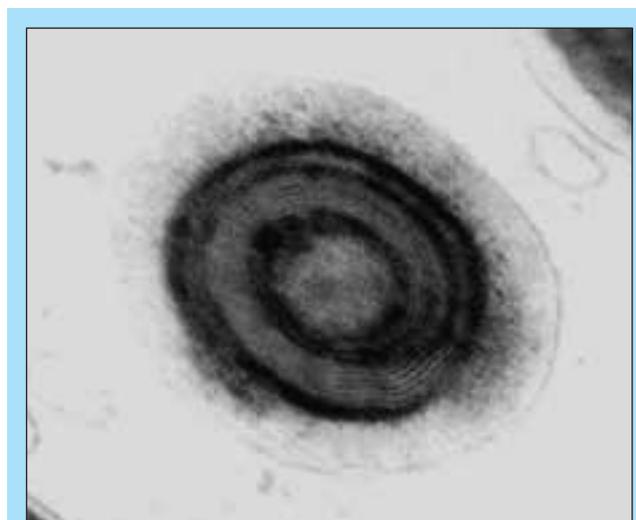


FIGURA 2 - Particolare del core di un granulo specifico in cui si osserva la struttura lamellare concentrica.

In immagini ultrastrutturali, è stata indicata, ma non specificamente descritta, la presenza di due ulteriori organelli specifici negli eosinofili del gatto, i granuli primari e i corpi lipidici¹⁶. I granuli primari erano stati precedentemente descritti nella specie felina anche in studi ultrastrutturali sui precursori midollari degli eosinofili²⁴. Questi granuli, negli eosinofili umani, sono detti primari proprio perché compaiono precocemente nel processo di maturazione cellulare nel midollo osseo ma si riducono poi di numero, da 1 a 3 per cellula matura^{1,21}. I granuli primari, privi di *core*, nei Primati contengono la proteina cristallina di Charcot-Leyden, una lectina la cui funzione non è ancora chiara²⁵. L'immunolocalizzazione di questa proteina, assente nei granuli specifici, ha permesso la differenziazione fra granuli primari e granuli specifici negli eosinofili umani^{26,27}. Studi simili, che dimostrino il diverso contenuto proteico dei granuli specifici e dei primari, sarebbero probabilmente necessari anche nel gatto per poter stabilire se quanto descritto come granuli primari non rappresenti in realtà l'immagine di granuli specifici in cui, sulla superficie della sezione, non sia stato incluso il *core*.

I corpi lipidici, negli eosinofili umani, sono organelli osmioidi, privi di membrana, tondeggianti, con un diametro anche superiore a 1 µm, ed in numero di circa 9 per cellula in sezioni trasversali²⁷. Questi organelli sono sede della sintesi di eicosanoidi pro-infiammatori²⁸. Vale la pena ricordare che nelle immagini ultrastrutturali in cui vengono indicati i corpi lipidici negli eosinofili felini questi, a differenza di quanto descritto negli eosinofili umani, non appaiono osmioidi¹⁶. Inoltre, in studi citochimici, gli eosinofili felini hanno dato reazione negativa al nero di Sudan, come se non contenessero lipidi^{29,30}. Da queste osservazioni scaturisce che sono necessari ulteriori studi per definire la presenza dei corpi lipidici negli eosinofili del gatto.

PRODUZIONE, TRAFFICKING E RECRUITMENT TISSUTALE

Gli eosinofili sono prodotti nel midollo osseo da cellule pluripotenziali da cui poi deriva, nel gatto come in altre specie, una linea cellulare separata di progenitori degli eosinofili³¹. La produzione di eosinofili nel midollo, nella specie umana, è stimolata principalmente da tre citochine, IL-3, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) e IL-5. Di queste tre citochine, solo IL-5 è specifica per gli eosinofili¹. Il DNA complementare (cDNA) dell'IL-5 felina è stato caratterizzato ed ha mostrato un'omologia del 72% con la sequenza del cDNA dell'IL-5 umana³², ma l'attività biologica di questa citochina nel gatto, al momento, non è stata ancora studiata.

Gli eosinofili umani sono cellule con emivita relativamente breve (8-18 ore) nel sangue periferico, mentre risiedono prevalentemente nei tessuti, in cui sopravvivono circa 2-5 giorni¹. A questo proposito non esistono dati specifici per il gatto di cui l'autrice sia a conoscenza. Nella specie umana gli eosinofili vengono richiamati in sede d'infiammazione da numerose chemochine, tra cui *Regulated upon Activation, Normal T-Expressed and Secreted* (RANTES), alcune *Monocyte Chemoattractant Proteins* (MCPs) e, soprattutto, eotaxina^{33,34}.

Nel gatto, mediante tecniche di biologia molecolare, è stata dimostrata l'espressione di RNA messaggero deputato alla sintesi di RANTES sia in cute normale di gatti clinicamente sani che in cute normale e lesa di gatti con complesso del granuloma eosinofilo³⁵. Dato che l'espressione era superiore nella cute lesa, è stato ipotizzato che RANTES rappresenti anche nella specie felina una chemochina importante per il richiamo degli eosinofili nella sede d'infiammazione³⁵.

Gli stimoli considerati importanti nel gatto per richiamare gli eosinofili in sede tissutale sono rappresentati principalmente da parassiti, elminti e non, e da reazioni di ipersensibilità, in particolare di tipo I. L'associazione tra presenza di parassiti, soprattutto di grandi dimensioni, non fagocitabili, ed eosinofili, è documentata nel gatto, così come in altre specie animali, da numerose osservazioni istologiche in malattie spontanee ed in alcuni studi sperimentali^{36,37,38}.

Nelle reazioni di ipersensibilità cutanee, data la difficoltà di documentarle nella specie felina, l'associazione con la presenza di eosinofili tissutali, anche se comunemente riportata^{38,39}, è supportata da pochi studi sperimentali, i cui risultati non sono stati a volte conclusivi. In uno studio su 7 gatti sensibili nei confronti delle pulci, l'inoculazione intradermica di un antigene proveniente da pulci è stata in grado di causare, 24 ore dopo, un'infiammazione eosinofila in 6 pazienti su 7⁴⁰. In uno studio su 2 gatti sensibili a un estratto antigenico di *Aedes albopictus*, la puntura della zanzara *Aedes albopictus* ha causato un'infiammazione eosinofila dopo 48 ore⁴¹. Sembra quindi che nel gatto, al pari di quanto accade in altre specie, gli eosinofili partecipino alla fase ritardata dei processi infiammatori cutanei caratterizzati da una reazione di ipersensibilità di tipo I⁴².

D'altra parte, in uno studio su 6 gatti con complesso del granuloma eosinofilo, in cui non era stato valutato lo stato di sensibilizzazione nei confronti dell'allergene *Felis domesticus* I (Feld I), lo stesso allergene non è stato in grado di indurre chemiotassi di eosinofili 48 ore dopo la sua applicazione sulla superficie cutanea⁴³. Vale la pena segnalare che anche in uno studio *in vitro*, utilizzando eosinofili umani provenienti da donatori sani, l'allergene Feld I, a differenza di altri allergeni provenienti da acari della polvere e piante, non è stato in grado di causare chemiotassi di eosinofili⁴⁴.

Per quanto riguarda l'apparato respiratorio, è stato osservato in numerosi studi che l'esposizione ad allergeni nebulizzati in gatti precedentemente sensibilizzati in modo sperimentale nei confronti degli stessi allergeni, induce broncoostrizione dopo pochi minuti, eosinofilia nel fluido proveniente dal lavaggio broncoalveolare dopo 24 ore, e infiammazione eosinofila nella sottomucosa e nell'epitelio delle vie respiratorie dopo esposizioni ripetute all'allergene nell'arco di 6 settimane^{45,46,47}. In base a queste osservazioni il gatto è stato proposto come modello sperimentale dell'asma umana⁴⁶.

Gli eosinofili sembrano essere attratti in sede d'infiammazione anche in corso di infezioni virali oculari e cutanee sostenute da herpesvirus felino (FHV-1)^{48,49}. Tuttavia, resta poco chiara al momento la relazione causale fra FHV-1 ed eosinofili.

ATTIVAZIONE E DEGRANULAZIONE

Gli eosinofili umani, in pazienti con malattie eosinofili- che, vanno di solito incontro ad una pre-attivazione (*priming*) nel sangue periferico, quindi, una volta raggiunti i tessuti sede d'inflammazone, grazie a stimoli secretagoghi, l'attivazione culmina con la degranulazione¹.

I criteri per valutare lo stato di attivazione degli eosinofili sono diversi, tuttavia le prove funzionali *in vitro* rappresentano probabilmente il *gold standard* perché valutano l'incremento delle attività biologiche delle cellule, quali la longevità, la produzione di citochine e/o le capacità citotossiche. Oltre alle prove funzionali, anche le modificazioni morfologiche possono essere utili per valutare lo stato di attivazione e, soprattutto, di degranulazione cellulare. Recentemente, nella specie umana, vengono impiegate anche tecniche citofluorimetriche con cui si identificano gli eosinofili attivati in base alle modifiche del fenotipo⁵⁰.

Per quanto riguarda il gatto, lo stato di attivazione degli eosinofili non è stato al momento documentato, che sia noto all'autrice, né tramite prove funzionali né tramite citofluorimetria, essendo sconosciuto l'immunofenotipo degli eosinofili felini, sia a riposo che attivati. Sono state invece riportate nel gatto modificazioni morfologiche degli eosinofili suggestive di attivazione e degranulazione, documentate sia tramite la valutazione della densità cellulare sia con esami ultrastrutturali.

Sono stati identificati, tramite separazione per gradiente di densità, eosinofili "ipodensi" sia su sangue periferico, in gatti trattati con IL-2⁵¹, che su materiale proveniente da lavaggio broncoalveolare, in gatti sensibilizzati sperimentalmente e stimolati con allergeni nebulizzati⁴⁶. Gli eosinofili umani "ipodensi" sono considerati attivati perché, in numerosi studi *in vitro*, è stato dimostrato che sono più longevi in coltura e con attività biologiche aumentate rispetto ai "normodensi"^{52,53,54,55}. Si ipotizza che la ridotta densità sia attribuibile alla perdita parziale del contenuto proteico dei granuli, infatti con studi ultrastrutturali su eosinofili "ipodensi" sono state osservate alterazioni morfologiche suggestive di degranulazione⁵⁶. Tuttavia, non è stato ancora raggiunto un consenso nella comunità scientifica sull'origine degli eosinofili "ipodensi"^{57,58}.

Inoltre, con studi ultrastrutturali, è stata recentemente osservata una morfologia di degranulazione sia in eosinofili felini circolanti¹⁹ che tissutali⁵⁹. Una volta attivati, gli eosinofili umani possono degranulare attraverso tre modalità distinte, l'esocitosi, di solito composta, la degranulazione di tipo *piecemeal* (PMD) e la degranulazione citotossica (citolisi)⁶⁰.

Nell'esocitosi composta, simile a quella osservata nei basofili e nei mastociti, i granuli si fondono tra loro all'interno del citoplasma in grandi "camere di degranulazione" che poi si fondono con la membrana cellulare perché il loro contenuto fuoriesca dalla cellula²¹. Questo tipo di degranulazione non è stato riportato frequentemente negli eosinofili umani *in vivo*²⁷ ed al momento, che sia noto all'autrice, non è stato ancora descritto in studi ultrastrutturali nel gatto.

Nella PMD il contenuto dei granuli viene trasferito a vescicole di trasporto provviste di membrana, forse identificabili con i VTO, che fuoriescono dal granulo stesso come per "gemmazione" e veicolano poi il contenuto del granulo

fuori dalla cellula. Come conseguenza i granuli vengono progressivamente svuotati del loro contenuto ma il numero di granuli resta inalterato. Recentemente, è stato messo in dubbio che il contenuto del granulo fuoriesca per "gemmazione", non è stato possibile infatti identificare nei granuli specifici alcune proteine, le *Vesicle-Associated Membrane Proteins* (VAMP)-2, localizzate nelle vescicole di trasporto⁶¹. Tuttavia, l'inibizione di VAMP-7, presente nei granuli specifici, inibisce il rilascio di EPO ed EDN⁶², quindi è possibile che parte delle vescicole di trasporto, anche se non la totalità, derivi dai granuli specifici, come dimostrato recentemente, con tecniche ultrastrutturali sofisticate, in eosinofili umani stimolati con eotaxina²³. La PMD è frequente *in vivo* negli eosinofili tissutali in corso di varie malattie infiammatorie^{63,64}, è stata osservata negli eosinofili circolanti⁵⁶ ed è stata descritta anche *in vitro*^{65,66}.

Recentemente, anche negli eosinofili circolanti di gatti con eosinofilia periferica, è stata riportata una morfologia suggestiva di PMD¹⁹. In eosinofili felini caratterizzati da modificazioni ultrastrutturali tipiche di uno stato d'attivazione, quali un apparato del Golgi ben sviluppato, numerosi mitocondri e particelle di glicogeno ed un numero elevato di VTO, sono stati osservati granuli privi di *core* o con fuoriuscita di parte del *core stesso* dal granulo, come per "gemmazione", cioè aspetti ultrastrutturali caratteristici della PMD¹⁹ (Figg. 3, 4).

La possibilità che gli eosinofili circolanti vadano incontro a PMD *in vivo* è tuttora oggetto di speculazioni, dato che, anche se una pre-attivazione può essere raggiunta nel sangue periferico, la degranulazione dovrebbe avvenire invece in sede tissutale. Si ipotizza quindi che, in pazienti umani con eosinofilia periferica, gli eosinofili circolanti pre-attivati siano sì più suscettibili a rilasciare il contenuto dei granuli, ma che la PMD avvenga *in vitro*, per effetto della manipolazione delle cellule, inclusa la centrifugazione^{67,68,69}. Nello studio eseguito nel gatto la centrifugazione non ha apparentemente modificato la morfologia cellulare, tuttavia ciò non esclude che la degranulazione sia comunque avvenuta *in vitro*¹⁹.

Inoltre, nello studio eseguito nel gatto, non è stata osservata correlazione positiva fra il numero totale di eosinofili circolanti ed il numero di eosinofili con morfologia di PMD¹⁹. Questa osservazione è stata ulteriormente confermata in uno studio morfometrico su un numero maggiore di eosinofili circolanti provenienti da gatti con e senza eosinofilia periferica (dati non pubblicati). Risultati analoghi sono stati ottenuti anche in alcuni studi su eosinofili circolanti umani, in cui è stato inoltre osservato che il numero di eosinofili attivati circolanti è più indicativo della gravità della malattia eosinofila in corso rispetto al numero totale di eosinofili circolanti^{56,70,71}. Quindi, dato che gli eosinofili attivati, *in vivo* o *in vitro*, rilasciano le proteine granulari, il dosaggio immunoenzimatico di queste proteine (soprattutto ECP) nel siero e/o in altri fluidi biologici è stato proposto come criterio utile per valutare la gravità di varie malattie allergiche, in particolare asma e dermatite atopica^{72,73,74}. Tuttavia, al momento, non è stato ancora raggiunto un consenso nella comunità scientifica, infatti molti studi non confermano la maggiore utilità del dosaggio delle proteine granulari rispetto alla valutazione dell'eosinofilia periferica per stabilire la gravità della malattia eosinofila in atto^{75,76,77}. Sarebbe interessante poter misu-

rare la concentrazione di una o più delle proteine granulari degli eosinofili del gatto nei vari fluidi biologici, siero incluso, per valutarne un possibile impiego nella clinica. Sfortunatamente non esistono al momento anticorpi, di cui l'autrice sia a conoscenza, in grado di riconoscere le proteine granulari degli eosinofili felini.

Per quanto riguarda il terzo meccanismo di degranulazione, la cosiddetta degranulazione citotossica, o citolisi, questa è caratterizzata da cromatolisi e rottura della membrana cellulare con rilascio quindi del contenuto cellulare *in toto*, inclusi i granuli specifici, a volte ancora rivestiti dalla loro membrana^{78,79}. È probabilmente uno dei meccanismi più frequenti di rilascio del contenuto dei granuli degli eosinofili umani tissutali^{63,80,81} ed è stata descritta anche *in vitro*^{82,83}, mentre, che sia noto all'autrice, non è stata riportata in eosinofili circolanti. È tuttora controverso se questo tipo di degranulazione rappresenti un processo attivo o un

danno cellulare passivo^{84,85}. Si ipotizza anche che la citolisi possa essere conseguenza degli effetti citotossici delle proteine granulari rilasciate per PMD, infatti numerosi granuli in corso di citolisi presentano una morfologia suggestiva di PMD, come se la PMD precedesse la citolisi^{60,64,85}.

Anche nel gatto è stato recentemente riportato che gli eosinofili tissutali possono andare incontro a citolisi⁵⁹. Eosinofili con morfologia sia di citolisi che di PMD sono stati osservati in studi ultrastrutturali su sezioni cutanee provenienti da gatti con lesioni del complesso del granuloma eosinofilo⁵⁹ (Figg. 5, 6). Nello studio effettuato, in 6 pazienti su 8, il numero di eosinofili con morfologia di citolisi era superiore rispetto a quello di eosinofili con morfologia di PMD. La citolisi, almeno in questi casi, sembrava quindi predominare come meccanismo di degranulazione, al pari di quanto osservato in certe malattie eosinofiliche umane⁶⁹. Inoltre, calcolando l'indice di de-



FIGURA 3 - Eosinofilo circolante di gatto con morfologia di degranulazione piecemeal (PMD). In uno dei granuli specifici si osserva la fuoriuscita di materiale osmiodenso, probabilmente proveniente dal core (freccia). Si osservano inoltre numerosi mitocondri e VTO, ed un apparato del Golgi ben sviluppato, suggestivi di uno stato di attivazione cellulare.

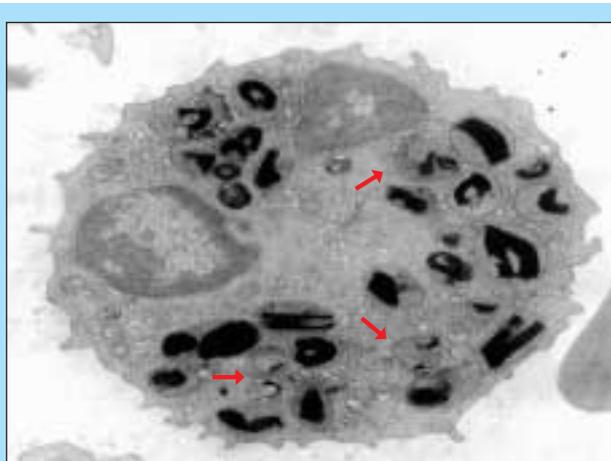


FIGURA 4 - In questo eosinofilo circolante di gatto, la PMD è più intensa rispetto alla Figura 3. Si osservano, oltre a numerose vescicole e mitocondri, granuli specifici contenenti solo frammenti di cores (freccie).

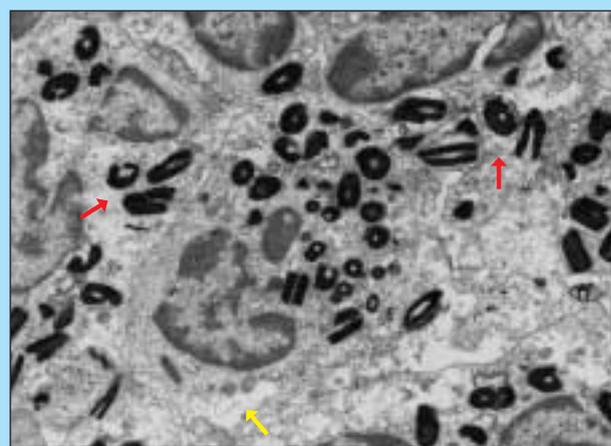


FIGURA 5 - Immagine ultrastrutturale di eosinofili tissutali citolitici nella cute di un gatto con complesso del granuloma eosinofilo. La membrana cellulare è rotta (freccia gialla) e sono presenti numerosi granuli specifici extracellulari (freccie rosse), alcuni dei quali ancora provvisti di membrana. Sono presenti inoltre detriti cellulari provenienti dalla citolisi (per gentile concessione di M. Bardagi).



FIGURA 6 - Immagine ultrastrutturale di un eosinofilo tissutale con morfologia di PMD nella cute di un gatto con complesso del granuloma eosinofilo. Si osservano granuli specifici con frammentazione dei cores e, in un granulo, è visibile la fuoriuscita di materiale osmiodenso, probabilmente proveniente dal core (freccia) (per gentile concessione di M. Bardagi).

granulazione degli eosinofili *piecemealed*, non è stata osservata una correlazione positiva fra il numero di eosinofili con indice di degranulazione elevato, cioè intensa PMD, ed il numero di eosinofili citolitici. Questo risultato, nonostante siano stati osservati granuli liberi con morfologia di PMD, supporterebbe l'ipotesi che PMD e citolisi sono due meccanismi distinti e che non necessariamente la PMD precede la citolisi⁸⁵.

Resta ancora sconosciuto, al momento, il significato biologico di questi due meccanismi di degranulazione. Tuttavia, considerando che la PMD, a differenza della citolisi, rispetta l'integrità cellulare ed è progressiva, potrebbe essere più utile in quei processi infiammatori in cui si richiede un'azione immunomodulatrice degli eosinofili piuttosto che citolesiva^{85,86}. Inoltre, la PMD permette un rilascio selettivo del contenuto dei granuli, in funzione dello stimolo dell'attivazione e quindi della degranulazione degli eosinofili. Questa selettività, importante per la modulazione della risposta infiammatoria, riguarda sia proteine granulari^{87,88} che citochine⁸⁹ e chemochine⁹⁰.

ATTIVITÀ BIOLOGICHE

Le attività biologiche degli eosinofili dipendono dal loro contenuto ed in particolare dal contenuto proteico dei granuli specifici. Con studi di immunoelettromicroscopia su eosinofili umani, è stato osservato che le quattro proteine basiche presenti nei granuli sono ospitate selettivamente, MBP nel *core*, e EPO, EDN e ECP nella *matrix*^{1,91}. MBP, ECP ed EPO possiedono attività elmintotossica, citotossica, e battericida, mentre la EDN è scarsamente elmintotossica e citotossica ma è neurotossica. Inoltre, sia ECP che EDN, appartengono alla cosiddetta superfamiglia delle Ribonucleasi A, hanno quindi attività enzimatica (ribonucleasi), maggiore nella EDN che nella ECP^{1,91}.

Recentemente, in uno studio sperimentale su eosinofili peritoneali, è stato dimostrato che anche i granuli degli eosinofili del gatto contengono una MBP (massa molecolare di circa 10kDa) e una ribonucleasi (massa molecolare di circa 15-18 kDa), la cui sequenza aminoacidica è stata parzialmente caratterizzata ed ha evidenziato per la MBP un'identità del 44% con MBP murina e MBP-2 umana e per la ribonucleasi un'identità del 60% e del 50% rispettivamente con ECP e EDN umane⁹². La MBP appare essere la proteina granulare più abbondante negli eosinofili del gatto⁹², al pari di quanto riportato in altre specie⁹³.

È stato inoltre dimostrato, con tecniche spettrofotometriche, che le proteine granulari degli eosinofili del gatto, al pari di quelle degli eosinofili di tutte le altre specie studiate e a differenza di quanto precedentemente riportato in studi citochimici^{18,30}, hanno anche un'attività enzimatica di perossidasi⁹².

La perossidasi degli eosinofili del gatto, analogamente a quanto riportato in altre specie, ha una massa molecolare maggiore rispetto a MBP e ribonucleasi, superiore ai 30 kDa. Tutte le proteine presenti nei granuli specifici degli eosinofili del gatto, MBP, ribonucleasi e perossidasi, hanno inoltre dimostrato possedere un'attività antibatterica nei confronti di *Escherichia coli*⁹². Ciò rende la ribonucleasi degli eosinofili del gatto funzionalmente più simile alla ECP umana piuttosto che alla EDN.

Da un punto di vista filogenetico è importante che le proteine granulari abbiano mantenuto le loro funzioni, in particolare ribonucleasi, perossidasi e battericida, negli eosinofili dei diversi Ordini di mammiferi finora studiati⁹². Ciò indica che probabilmente c'è stata una pressione evolutiva che ha determinato questa conservazione, suggerendo quindi un ruolo fisiologico importante delle proteine granulari nei meccanismi di difesa dell'organismo, molto probabilmente legato primariamente all'attività antielmintica⁹⁴. Sarebbe interessante quindi studiare quest'ultima attività anche per le proteine granulari degli eosinofili del gatto. Finora, che sia noto all'autrice, è stata solo dimostrata l'adesione *in vitro* degli eosinofili del gatto a microfilarie di *Brugia pahangi* ma non è stata poi studiata l'azione specifica degli eosinofili sul parassita⁹⁵.

Riguardo alle funzioni della ribonucleasi presente negli eosinofili, la EDN, la ribonucleasi più potente contenuta negli eosinofili umani, come già accennato, è al momento oggetto di studio per un suo potenziale ruolo protettivo nei confronti di infezioni sostenute da virus a RNA a catena singola, quale il virus respiratorio sinciziale^{96,97}. Sarebbe interessante studiare il potenziale ruolo antivirale anche della ribonucleasi presente negli eosinofili felini, vista anche l'associazione fra eosinofili e malattie cutanee ed oculari virali sostenute da FHV-1, pur essendo quest'ultimo un virus a DNA a doppia catena.

Le funzioni della EPO umana, al momento, sono considerate collegate sia all'attività battericida che alla parassitocida⁹⁸. L'azione antibatterica della EPO felina, a differenza di quanto riportato in altre specie, è risultata essere inferiore rispetto a quella della MBP e della ribonucleasi⁹². Tuttavia, per approfondire le attività biologiche della EPO felina, sarebbe necessario ottenerne una maggiore quantità utilizzando metodi di estrazione e rilascio delle proteine granulari più specifici per la perossidasi, come descritto per gli eosinofili umani⁹⁹.

L'attività battericida delle proteine granulari degli eosinofili, umani e di altre specie, incluso il gatto, suggerisce un ruolo protettivo di queste cellule nella risposta immunitaria innata nei confronti di infezioni batteriche. Tuttavia, l'importanza di questo ruolo resta da definire, infatti, *in vivo*, l'attività antibatterica appare essere svolta primariamente da altre cellule del sistema immunitario, tra cui i neutrofili.

Negli eosinofili umani, oltre alle proteine basiche granulari, sono stati identificati numerosi mediatori, tra cui citochine, chemochine, enzimi ed eicosanoidi^{1,89,100}. Questa varietà di mediatori rende gli eosinofili importanti non solo come cellule con capacità citotossiche, ma anche come cellule in grado di modulare il tipo di risposta immunitaria, Th1 o Th2^{100,101}.

Negli eosinofili felini, oltre alla presenza delle proteine granulari con funzioni enzimatiche (ribonucleasi e perossidasi) e battericide, sono stati evidenziati indirettamente, con tecniche citochimiche, alcuni enzimi, tra cui fosfatasi acida ed alcalina^{18,30}. Questi enzimi potrebbero partecipare, come negli eosinofili umani, ai processi digestivi intra- e/o extra-cellulari¹. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari nel gatto per definire il contenuto, enzimatico e non, degli eosinofili.

Inoltre, recentemente, con tecniche immunoistochimiche, è stata osservata istamina in eosinofili circolanti di

gatto, ed è stato ipotizzato che gli eosinofili felini attivati siano in grado, a differenza di tutte le altre specie finora studiate, di produrre istamina e scatenare quindi reazioni di ipersensibilità di tipo I⁰². Tuttavia, non è possibile escludere che l'istamina presente negli eosinofili possa essere entrata per endocitosi, considerando che gli eosinofili, almeno nella specie umana, esprimono recettori funzionali per l'istamina¹⁰³.

PROSPETTIVE FUTURE

Da quanto scritto appare che sono necessari ulteriori studi per caratterizzare gli eosinofili del gatto, soprattutto dal punto di vista funzionale. Dato che la ricerca scientifica si dirige verso la riduzione dell'uso sperimentale di animali vivi, sarebbe molto utile ottenere colture di eosinofili felini, utilizzando tecniche, già impiegate con eosinofili umani, che ne prolunghino la sopravvivenza *in vitro*¹⁰⁴.

Inoltre, ed a partire da qui, sarebbe importante non solo caratterizzarne il contenuto in modo più approfondito ma anche purificare maggiori quantità di proteine granulari per ottenere proteine ricombinanti e poter quindi produrre anticorpi specifici, utili sia nell'ambito della ricerca che della clinica. Restano inoltre da chiarire, nella maggior parte delle malattie del gatto caratterizzate da infiammazione eosinofila, gli stimoli che determinano il *recruitment* degli eosinofili in sede tissutale. Quest'ultimo punto sarebbe importante per considerare un possibile impiego nel gatto di terapie, biologiche e non, anti-chemochine e anti-citochine, oggetto di studio al momento nella specie umana¹⁰⁵.

Parole chiave

Eosinofili, gatto, granuli, degranulazione.

Key words

Eosinophils, cat, granules, degranulation.

Bibliografia

- Kita H, Adolphson CR, Gleich GJ: Biology of Eosinophils. In: Middleton's Allergy Principles & Practice. Ed by NF Adkinson, JW Yunginger, WW Busse, BS Bochner, ST Holgate, FER Simons. Philadelphia, Mosby, 2003, pp 305-332.
- Wardlaw AJ, Moqbel R, Barry Kay A: Eosinophils: biology and role in disease. *Adv Immunol* 60:151-266, 1995.
- Adamko D, Odemuyiwa SO, Vethanayagam D, Moqbel R: The rise of the phoenix: the expanding role of the eosinophil in health and disease. *Allergy* 60:13-22, 2005.
- Dombrowicz D, Capron M: Eosinophils, allergy and parasites. *Curr Opin Immunol* 13:716-720, 2001.
- Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, et al: Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356:2144-2148, 2000.
- Nomura A, Uchida Y, Sakamoto T, et al: Increases in collagen type I synthesis in asthma: the role of eosinophils and transforming growth factor- β . *Clin Exp All* 32:860-865, 2002.
- Kay AB, Flood-Page P, Menzies-Gow A, et al: Eosinophils in repair and remodelling. *Clin Exp All Rev* 4:229-236, 2004.
- Pégorier S, Wagner LA, Gleich GJ, Pretolani M: Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells. *J Immunol* 177:4861-4869, 2006.
- Rosenberg HF, Domachowske JB: Eosinophils, eosinophil ribonucleases and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol* 70:691-698, 2001.
- Temkin V, Aingorn H, Puxeddu I, et al: Eosinophil major basic protein: First identified natural heparanase-inhibiting protein. *J Allergy Clin Immunol* 113:703-709, 2004.
- Munitz A, Levi-Schaffer F: Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy* 59:268-275, 2004.
- Klion AD, Nutman TB: The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol* 113:30-37, 2004.
- Simons JE, Rothenberg ME, Lawrence RA: Eotaxin-1-regulated eosinophils have a critical role in innate immunity against experimental *Brugia malayi* infection. *Eur J Immunol* 35:189-197, 2005.
- Meeusen ENT, Balic A: Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today* 16:95-101, 2000.
- Meeusen ENT: Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. *Vet Parasitol* 84:259-273, 1999.
- Young KM: Eosinophils. In: Schalm's Veterinary Hematology. Ed by BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2000, pp 297-307.
- Ward JM, Wright JF, Wharran GH: Ultrastructure of granulocytes in the peripheral blood of the cat. *J Ultrastruct Res* 39:389-396, 1972.
- Presentey B, Jerushalm Z, Ben-Bassat M, Perk K: Genesis, ultrastructure and cytochemical study of the cat eosinophil. *Anat Rec* 196:119-127, 1980.
- Fondati A, Fondevila D, Ferrer L: Piecemeal degranulation (PMD) morphology in feline circulating eosinophils. *Res Vet Sci* 75:127-132, 2003.
- Persson T, Calafat J, Janssen H, et al: Specific granules of human eosinophils have lysosomal characteristics: presence of lysosome-associated membrane proteins and acidification upon cellular activation. *Biochem Biophys Res Commun* 291:844-854, 2002.
- Egsten A, Calafat J, Janssen H, et al: Granules of human eosinophilic leukocytes and their mobilization. *Clin Exp All* 31:1173-1188, 2001.
- Calafat BJ, Kuijpers TW, Janssen H, et al: Evidence for small intracellular vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b558 and the adhesion molecule CD11b/CD18. *Blood* 81:3122-3129, 1993.
- Melo RCN, Spencer LA, Perez SAC, et al: Human eosinophils secrete preformed, granule-stored Interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic* 6:1047-1057, 2005.
- Canfield PJ: An ultrastructural study of granulocytic development in feline bone marrow. *Vet Med C Anat Histol Embryol* 13:97-107, 1984.
- Ackerman SJ, Liu L, Kwatia MA, et al: Charcot-Leyden crystal protein (Galectin-10) is not a dual function galectin with lysophospholipase activity but binds a lysophospholipase inhibitor in a novel structural fashion. *J Biol Chem* 277:14859-14868, 2002.
- Dvorak AM, Letourneau L, Login GR, et al: Ultrastructural localization of the Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to a distinct crystalloid-free granule population in mature human eosinophils. *Blood* 72:150-158, 1988.
- Dvorak AM, Weller PF: Ultrastructural analysis of human eosinophils. *Chem Immunol* 76:1-28, 2000.
- Bandeira-Melo C, Bozza PT, Weller PF: The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol* 109:393-400, 2002.
- Tsujimoto H, Hasegawa A, Tomoda I: A cytochemical study of feline blood cells. *Jpn J Vet Sci* 45:373-382, 1983.
- Jain NC, Kono CS, Madewell BR: Cytochemical studies of normal feline blood and bone marrow cells. *Blut* 58:195-199, 1989.
- Young KM, Moriello KA: Characterization of eosinophil progenitor cells in feline bone marrow. *Am J Vet Res* 58:348-353, 1997.
- Padrid PA, Qin Y, Wells TNC, et al: Sequence and structural analysis of feline interleukin-5 cDNA. *Am J Vet Res* 59:1263-1269, 1998.
- Adamko D, Lacy P, Moqbel R: Mechanisms of eosinophil recruitment and activation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2:107-116, 2002.
- Lampinen M, Carlson M, Håkansson LD, Venge P: Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 59:793-805, 2004.
- Kimura T, Kano R, Maeda S, et al: Expression of RANTES mRNA in skin lesions of feline eosinophilic plaque. *Vet Derm* 14:269-273, 2003.
- Parsons JC, Bowman DD, Grieve RB: Pathological and haematological responses of cats experimentally infected with *Toxocara canis* larvae. *Int J Parasitol* 19:479-488, 1989.
- Jones TC, Hunt RD, King NW: Veterinary pathology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.
- Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK: Skin diseases of the dog and cat. Clinical and Histopathologic diagnosis. Oxford, Blackwell Science Ltd, 2005.

36 *Gli eosinofili del gatto*

39. Scott DW, Miller WH, Griffin CE: *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. Philadelphia, WB Saunders Co, 2001.
40. Lewis DT, Ginn PE, Kunkle GA: Clinical and histological evaluation of immediate and delayed flea antigen intradermal skin test and flea bite sites in normal and flea-allergic cats. *Vet Dermatol* 10:29-37, 1999.
41. Nagata M, Ishida T: Cutaneous reactivity to mosquito bites and its antigens in cats. *Vet Dermatol* 8:19-26, 1997.
42. Day MJ: *Clinical Immunology of the dog and cat*. London, Manson Publishing Ltd, 2000.
43. Wisselink MA, van Ree R, Willemse T: Evaluation of *Felis domesticus* allergen I as a possible autoallergen in cats with eosinophilic granuloma complex. *Am J Vet Res* 63:338-341, 2002.
44. Svensson L, Rudin A, Wennerås C: Allergen extracts directly mobilize and activate human eosinophils. *Eur J Immunol* 34:1744-1751, 2004.
45. Padrid PA, Mitchell RW, Ndukwu IM, et al: Cyproheptadine-induced attenuation of type-1 immediate-hypersensitivity reactions of airway smooth muscle from immune-sensitized cats. *Am J Vet Res* 56:109-115, 1995.
46. Padrid P, Cozzi P, Leff AR: Cyclosporine A inhibits airway reactivity and remodeling after chronic antigen challenge in cats. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1812-1818, 1996.
47. Reiner CR, Kendra CD, Byerly JR, et al: Effects of drug treatment on inflammation and hyperreactivity of airways and on immune variables in cats with experimentally induced asthma. *Am J Vet Res* 66:1121-1127, 2005.
48. Nasisse MP, Glover TL, Moore CP, Weigler BJ: Detection of feline herpesvirus 1 DNA in corneas of cats with eosinophilic keratitis or corneal sequestration. *Am J Vet Res* 59:856-858, 1998.
49. Hargis AM, Ginn PE, Mansell JEKL, Garber RL: Ulcerative facial and nasal dermatitis and stomatitis in cats associated with feline herpesvirus 1. *Vet Dermatol* 10:267-274, 1999.
50. Mawhorter SD, Stephany DA, Ottesen EA, Nutman TB: Identification of surface molecules associated with physiologic activation of eosinophils. Application of whole-blood flow cytometry to eosinophils. *J Immunol* 156:4851-8, 1996.
51. Tompkins MB, Novotney C, Grindem CB, et al: Human recombinant Interleukin-2 induces maturation and activation signals for feline eosinophils in vivo. *J Leuk Biol* 48:531-540, 1990.
52. Owen WF, Rothenberg ME, Silberstein DS, et al: Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J Exp Med* 166:129-141, 1987.
53. Rothenberg ME, Owen WF, Silberstein DS, et al: Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science* 237:645-647, 1987.
54. Rothenberg ME, Owen WF, Silberstein DS, et al: Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human Interleukin 3. *J Clin Invest* 81:1896-1992, 1988.
55. Rothenberg ME, Petersen J, Stevens RL, et al: IL-5 dependent conversion of normodense human eosinophils to the hypodense phenotype uses 3T3 fibroblasts for enhanced viability, accelerated hypodensity, and sustained antibody-dependent cytotoxicity. *J Immunol* 143:2311-2316, 1989.
56. Karawajczyk M, Sev us L, Garcia R, et al: Piecemeal degranulation of peripheral blood eosinophils. A study of allergic subjects during and out of the pollen season. *Am J Resp Cell Mol Biol* 23:521-529, 2000.
57. Fukuda T, Gleich GJ: Heterogeneity of human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 83:369-373, 1989.
58. Kroegel C, Virchow JC, Luttmann W, et al: Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leukocyte (Part I). *Eur Resp J* 7:519-543, 1994.
59. Bardag  M., Fondati A., Fondevila, Ferrer L: Ultrastructural study of cutaneous lesions in feline eosinophilic granuloma complex. *Vet Dermatol* 14:297-303, 2003.
60. Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R: Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 111:923-932, 2003.
61. Logan MR, Lacy P, Bablitz B, Moqbel R: Expression of eosinophil target SNAREs as potential cognate receptors for vesicle-associated membrane protein-2 in exocytosis. *J Allergy Clin Immunol* 109:299-306, 2002.
62. Logan MR, Lacy P, Odemuyiwa SO, et al: A critical role for vesicle-associated membrane protein-7 in exocytosis from human eosinophils and neutrophils. *Allergy* 61:777-784, 2006.
63. Erjef lt JS, Greiff L, Andersson M, et al: Allergen-induced eosinophil cytolysis is a primary mechanism for granule protein release in human upper airways. *Am J Resp Crit Care Med* 160:304-312, 1999.
64. Erjef lt JS, Greiff L, Andersson M, et al: Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax* 56:341-344, 2001.
65. Dvorak AM, Furitsu T, Letourneau L, et al: Mature eosinophils stimulated to develop in human cord mononuclear cell cultures supplemented with recombinant Interleukin-5. Part I. Piecemeal degranulation of specific granules and distribution of Charcot-Leyden crystal protein. *Am J Pathol* 138:69-82, 1991.
66. Dvorak AM, Ackerman SJ, Furitsu T, et al: Mature eosinophils stimulated to develop in human cord mononuclear cell cultures supplemented with recombinant Interleukin-5. Part II. Vesicular transport of specific granule matrix peroxidase, a mechanism for effecting piecemeal degranulation. *Am J Pathol* 140:795-807, 1992.
67. Berends C, Dijkhuizen B, De Monchy JGR, et al: Induction of low density and up-regulation of cd11b expression of neutrophils and eosinophils by dextrane sedimentation and centrifugation. *J Immunol Methods* 167:183-193, 1994.
68. Hoekstra MO, Berends C, Dijkhuizen B, et al: Dextran sedimentation induces a difference in the percentage of hypodense eosinophils in peripheral blood between children with allergic asthma and healthy controls. *Clin Exp Allergy* 24:969-975, 1994.
69. Malm-Erfj lt M, Stevens TR, Persson CGA, Erjef lt JS: Discontinuous percoll gradient centrifugation combined with immunomagnetic separation obviates the need for erythrocyte lysis and yields isolated eosinophils with minimal granule abnormalities. *J Immunol Methods* 288:99-109, 2004.
70. Peters MS, Gleich GJ, Dunnette SL, Fukuda T: Ultrastructural study of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome: a morphological basis of hypodense eosinophils. *Blood* 3:780-785, 1988.
71. Krouwels FH, Kerstens LCM, Van der Maarel HWM, et al: Density of eosinophils reflects activity of disease in allergic asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 25:1171-1178, 1995.
72. Miyasato M, Tsuda S, Nakama T, et al: Serum levels of eosinophil cationic protein reflect the state of in vitro degranulation of blood hypodense eosinophils in atopic dermatitis. *J Dermatol* 23:382-388, 1996.
73. Koller DY, Halmerbauer G, Frischer T, Roithner B: Assessment of eosinophil granule proteins in various body fluids: is there a relation to clinical variables in childhood asthma? *Clin Exp Allergy* 29:786-793, 1999.
74. Barck C, Lundahl J, Halld n G, Bylin G: Total eosinophil cationic protein levels in induced sputum as a marker of changes in eosinophilic inflammation in a patient with allergic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 95:86-92, 2005.
75. L nnkvist K, Hellman C, Lundhal J, et al: Eosinophil markers in blood, serum, and urine for monitoring the clinical course in childhood asthma: impact of budesonide treatment and withdrawal. *J Allergy Clin Immunol* 107:812-817, 2001.
76. Meijer RJ, Postma DS, Kauffman HF, et al: Accuracy of eosinophils and eosinophil cationic protein to predict steroid improvement in asthma. *Clin Exp Allergy* 32:1096-1103, 2002.
77. Selnes A, Dotterud LK: No association between serum eosinophil cationic protein and atopic dermatitis or allergic rhinitis in an unselected population of children. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:61-65, 2005.
78. Dvorak AM: Ultrastructural studies on mechanisms of human eosinophil activation and secretion. In: *Eosinophils in allergy and inflammation*. Clinical Allergy and Immunology. Ed by GJ Gleich, AB Kay. New York, Marcel Dekker Inc, 1994, pp 159-209.
79. Persson CGA, Erjef lt JS: Eosinophil lysis and free granules: an in vivo paradigm for cell activation and drug development. *Trends Pharmacol Sci* 18:117-123, 1997.
80. Erjef lt JS, Andersson M, Greiff L, et al: Cytolysis and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils. *Am J Resp Crit Care Med* 102:286-294, 1998.
81. Cheng JF, Ott NL, Peterson EA, et al: Dermal eosinophils in atopic dermatitis undergo cytolytic degeneration. *J Allergy Clin Immunol* 99:683-692, 1997.
82. Weiler CR, Kita H, Hukee M, Gleich GJ: Eosinophil viability during immunoglobulin-induced degranulation. *J Leukoc Biol* 60:493-501, 1996.
83. Yamazaki K, Gleich GJ, Kita H: Bile acids induce eosinophil degranulation by two different mechanisms. *Hepatology* 33:582-590, 2001.
84. Walsh GM: Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Curr Opin Hematol* 8:28-33, 2001.
85. Erjef lt JS, Persson CGA: New aspects of degranulation and fates of airway mucosal eosinophils. *Am J Resp Crit Care Med* 161:2074-2085, 2000.
86. Crivellato E, Nico B, Mallardi F, et al: Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 274:778-784, 2003.
87. Torpier G, Colombel JF, Mathieu-Chandelier C, et al: Eosinophilic gastroenteritis: evidence for a selective release of eosinophil major basic protein. *Clin Exp Immunol* 74:404-408, 1988.
88. Capron M, Tomassini M, Torpier G, et al: Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 88:54-58, 1989.

89. Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Weller PF: Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J Immunol* 166:4813-4817, 2001.
90. Lacy P, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, et al: Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon- γ in human eosinophils. *Blood* 94:23-32, 1999.
91. Giembycz MA, Lindsay MA: Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev* 51:213-339, 1999.
92. Fondati A, Carreras E, Fondevila D, et al: Characterization of biological activities of feline eosinophil granule proteins. *Am J Vet Res* 65:957-963, 2004.
93. Gleich G J, Loegering DA, Maldonado JE: Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. *J Exp Med* 137:1459-1471, 1973.
94. McEwen BJ: Eosinophils: a review. *Vet Res Commun* 16:11-44, 1992.
95. Johnson P, Mackenzie CD, Suswill R, Denham DA: Serum-mediated adherence of feline granulocytes to microfilaria of *Brugia pahangi* in vitro: variations with parasite maturation. *Parasite Immunol* 3:69-80, 1981.
96. Domachowske JB, Bonville CA, Dyer KD, Rosenberg HF: Evolution of antiviral activity in the ribonuclease A gene superfamily: evidence for a specific interaction between eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and respiratory syncytial virus. *Nucleic Acids Res* 26:5327-5332, 1998.
97. Dyer KD, Rosenberg HF: The RNase a superfamily: Generation of diversity and innate host defense. *Mol Divers* 2006. [Epub ahead of print]
98. Wang J, Slungaard A: Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology. *Arch Biochem Biophys* 445:256-260, 2006.
99. Adamko D, Wu Y, Gleich GJ, et al: The induction of eosinophil peroxidase release: improved methods of measurement and stimulation. *J Immunol Methods* 291:101-108, 2004.
100. Prussin C, Metcalfe DD: IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 117 (2 suppl): S450-456, 2006.
101. Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, et al: Cutting edge: Human eosinophils regulate T cell subset selection through Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J Immunol* 173:5909-5913, 2004.
102. Kadoya M, Momoi Y, Iwasaki T: Plasma histamine concentration and histamine detection in peripheral blood eosinophils in cats. *J Feline Med Surg* 8:302-308, 2006.
103. Buckland KF, Williams TJ, Conroy DM: Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H4 receptor. *Br J Pharmacol* 140:1117-1127, 2003.
104. Al-Rabia MW, Blaylock MG, Sexton DW, et al: Granule protein changes and membrane receptor phenotype in maturing human eosinophils cultured from CD34+ progenitors. *Clin Exp Allergy* 33:640-648, 2003.
105. Bochner BS: Verdict in the case of therapies versus eosinophils: The jury is still out. *J Allergy Clin Immunol* 113:3-9, 2004.

l'otologico
prima^{di}
scelta

amode.it

MARCHIO REGISTRATO

● **Potente azione antimicotica e battericida su gram + e gram -**

● **Basso rischio di resistenza e non ototossico**

● **Attività acaricida**

● **Azione rapida: remissione dei sintomi in soli 7 giorni**



Via M. Buonarroti, 23
Cologno Monzese - MI

JANSSEN
SCIENTIFICI

Distributore della Janssen - C. Neg. SpA

Basta trattamenti a metà!



Rilexine[®] Appetibile

La Cefalessina pensata per l'



- Compresse Appetibili
- Ottima Biodisponibilità grazie a Kollidon CL*
- Tre formati adatti ad ogni taglia
- Confezioni da 14 compresse
- Posologia: 30 mg/kg p.c. die

* Osservanza = capacità di seguire il trattamento nella sua totalità, in conformità con la prescrizione: dose, durata e frequenza delle somministrazioni. Globale poiché coinvolge Veterinario, Animale, Malattia, Proprietario, Prodotto

Virbac S.r.l.
Via dei Gracchi, 30 - 20146 Milano
Tel. 02 483345.1 - Fax 02 48002644
www.virbac.it

