

Valutazione del rapporto CD4+/CD8+ nei cani affetti da dermatite atopica prima e dopo terapia con ciclosporina A: risultati preliminari

RIASSUNTO

La ciclosporina A (CsA) è un immunomodulatore utilizzato in dermatologia per la terapia della dermatite atopica canina (CAD), tramite il blocco selettivo della secrezione delle citochine infiammatorie. Il rapporto CD4+/CD8+ è utilizzato per valutare lo stato immunitario: sue modificazioni possono essere legate ad una anomala risposta immunitaria specifica (alterazione Th1/Th2). Lo scopo del presente lavoro prospettico era valutare il rapporto CD4+/CD8+ in cani con CAD prima e dopo terapia con CsA. Sono stati selezionati 8 cani con CAD ed eseguiti prelievi ematici per citofluometria il giorno di inclusione (V0) e al giorno 30 (V30) e 90 (V90) dall'inizio della terapia farmacologica; il giorno delle visite venivano valutati anche i dati clinici di CADESI (Canine Atopic Dermatitis Extend Severity Index) e VAS (Visual Analogic Scale). Il gruppo di controllo era costituito da 8 cani clinicamente sani. L'analisi statistica è stata effettuata con software SPSS17: la differenza nella media dei valori di CADESI e rapporto CD4+/CD8+ è stata valutata tramite ANOVA per analisi ripetute; la differenza nella media dei valori di VAS è stata valutata tramite Friedman test non parametrico per misure ripetute; sono stati considerati significativi valori di p-value<0,05. I risultati hanno mostrato una differenza statisticamente significativa per CADESI (p=0,001) e VAS (Friedman test p=0,001) tra V0, V30 e V90. Le medie del rapporto CD4+/CD8+ sono risultate non statisticamente significative (ANOVA: p=0,694) tra V0, V30 e V90 ed anche rispetto al gruppo di controllo. In base ai risultati di questo studio, la somministrazione di CsA migliora le condizioni cliniche dei soggetti affetti da CAD (indice CADESI e VAS) senza modificare il rapporto CD4+/CD8+.

INTRODUZIONE

La ciclosporina A (CsA) è un macrolide oligopeptide ciclico con azione immunomodulatrice, utilizzato in dermatologia veterinaria nella terapia della dermatite atopica canina e in altre malattie a eziopatogenesi immunomediata/autoimmune¹. Il meccanismo di azione della CsA si focalizza in modo selettivo sul sistema immunitario inibendo la proliferazione dei linfociti T citotossici, la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B dipendenti dai linfociti T helper, l'attivazione dei fagociti mononucleati e dei T helper². Tutte queste funzioni sono raggiunte tramite il blocco della trascrizione genica delle citochine dei linfociti T, in particolar modo l'IL-2 (interleukina 2), che è essenziale per la proliferazione delle cellule T. La diretta conseguenza è l'inibizione dei fattori di trascrizione dei NFAT (nuclear factor of activated T cells) necessarie alla trascrizione di IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF (granulocyte monocyte-colony stimulating factor), TNF alfa (Tumor Necrosis Factor alfa), interferone gamma, e dei recettori di superficie CD40L e CTLA-4^{1,2,3}. Il farmaco blocca in questo modo la sintomatologia clinica della malattia infiammatoria in atto^{1,4,5}.

Recenti studi sperimentali hanno concentrato l'attenzione sulle due principali sottopopolazioni di linfociti T helper denominate Th1 e Th2. Queste cellule stimolano rispettivamente la risposta cellulo mediata (mediata dai linfociti T) e quella umorale (mediata dai linfociti B). La quantificazione indiretta dei linfociti Th1 e Th2, per valutare l'attività del

**Luisa Cornegliani¹, Stefano Comazzi²,
Massimo Beccati³, Valeria Martini²,
Antonella Vercelli¹**

¹ Ambulatorio Veterinario Associato, C.so Traiano 99/d,
10135 Torino

² Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità
Pubblica Veterinaria, Università di Milano

³ Centro Medico Veterinario Adda, Via Roma 3 Capriate (BG)

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 24/09/2011 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 20/01/2012”.

sistema immunitario, viene effettuata generalmente tramite tecniche di biologia molecolare (RT-PCR o real-time polymerase chain reaction) che si basano sull'identificazione del caratteristico pattern citochinico attivante la risposta cellulo mediata (Th1: IFN-gamma, IL-2, IL-12) o umorale (Th2: IL-4, IL-6)⁶. Questa metodica risulta tuttavia di difficile esecuzione nella pratica clinica. Il rapporto quantitativo tra le principali sottopopolazioni di linfociti T, i linfociti T helper (CD4+) ed i linfociti T citotossici (CD8+), viene spesso considerato una tecnica più semplice, seppur meno sensibile, per la valutazione della risposta immunitaria specifica. Il rapporto CD4+/CD8+ tende a muoversi in modo inversamente proporzionale alla risposta Th1/Th2 (in quanto le cellule Th2 sono la principale sottopopolazione delle cellule CD4+).

In corso di dermatite atopica dell'uomo, diversi studi hanno determinato un aumento dei linfociti T CD8+ rispetto ai CD4+^{7,8,9,10}, mentre un solo studio ha determinato alterazioni del rapporto CD4+/CD8+ in cani affetti da dermatite atopica complicata da dermatite da *Malassezia*¹¹.

Nell'uomo, la valutazione del rapporto CD4+/CD8+ con citofluorimetria è stata applicata per monitorare la risposta immunologica nei pazienti con dermatite atopica prima e dopo terapia con ciclosporina⁷. In particolare si è notato che si ha una diminuzione dei linfociti CD8+ a favore di quelli CD4+ nelle persone con DA cronica in terapia con CsA. Oggi sono disponibili, anche per l'uso nel cane, anticorpi specifici legati a diversi fluorofori, che permettono una valutazione precisa del rapporto CD4+/CD8+¹². Nel cane, il rapporto CD4+/CD8+ è stato valutato in cani affetti da cheratoconguntivite secca e trattati con CsA in soluzione topica al 2% al giorno 0 ed al giorno 30, fornendo dati interessanti sull'attività locale del farmaco e dei linfociti Th^{13,14}. In particolare, il numero dei linfociti CD8+ è diminuito con inversione del rapporto CD4+/CD8+ alla fine del trattamento. Poiché a livello locale la risposta immunitaria si modifica, è parso interessante indagare se tale evento si potesse verificare anche a livello sistemico nei cani con CAD sottoposti a terapia immunomodulatoria, non esistendo dati in letteratura a tale proposito.

Sulla base delle considerazioni sopraelencate, lo scopo del lavoro è stato valutare il rapporto CD4+/CD8+ in cani affetti da dermatite atopica, non complicata da infezioni e la sua eventuale variazione prima e dopo trattamento farmacologico con ciclosporina A.

MATERIALI E METODI

Animali

Il presente studio è stato condotto seguendo i dettami delle "good general practice" pubblicate

sulla Gazzetta Ufficiale (G.U. n° 289; 10-12-1996, 47-53) e previo consenso informato del proprietario. Sono stati selezionati un gruppo di 8 cani affetti da dermatite atopica ed un gruppo di controllo formato da altrettanti cani clinicamente esenti da malattie.

I cani selezionati per lo studio dovevano rispondere ai seguenti criteri d'inclusione: controllo mensile di ecto ed endoparassiti con antiparassitario efficace anche nei confronti degli acari della rogna sarcoptica; assenza clinica e citologica di infezioni da batteri o/e lieviti, dieta industriale di buona qualità da almeno 1 mese, trial dietetico ipoallergenico negativo eseguito con idrolisato industriale o dieta monoproteica casalinga per almeno 8-12 settimane; assenza di trattamenti con farmaci immunosoppressivi o immunomodulatori da almeno 2 mesi. La diagnosi di CAD era stata in precedenza effettuata tramite esclusione delle altre malattie a carattere pruriginoso, in accordo con i criteri stabiliti dall'*International Task Force on Canine Atopic Dermatitis*¹⁵, e con un test intradermico positivo. Sono stati inclusi cani con test intradermici esclusivamente positivi agli acari della polvere; eventuali positività ad altri aeroallergeni erano motivo di esclusione. Considerando la cronicità della malattia sono stati previsti trattamenti pre-inclusione o preparazione dei pazienti all'inclusione dello studio (visita di selezione o VS). Nello specifico, qualora il soggetto avesse presentato lesioni riferibili a infezioni batteriche, veniva prescritta una terapia antibiotica sistemica a discrezione del medico curante e/o secondo l'esito dell'esame colturale batteriologico con antibiogramma. Per eventuali infezioni da lieviti era indicata la somministrazione di itraconazolo a dose di 5 mg/kg/die a settimane alterne. La supplementazione con acidi grassi polinsaturi o nutraceutici non era consentita nel mese precedente l'inclusione. Pazienti con concomitante reazione allergica al cibo o/e dermatite allergica alle pulci sono stati esclusi.

Il gruppo di controllo, per l'esclusiva valutazione del rapporto CD4+/CD8+ nei cani normali, era rappresentato da soggetti venuti alla visita clinica per l'annuale vaccinazione, con assenza d'anamnesi per precedenti malattie dermatologiche o sistemiche. Per entrambi i gruppi non sono state stabilite restrizioni inerenti al sesso o alla razza, bensì di età. I cani di età minore di 1 anno o maggiore di 10 sono stati esclusi a priori. I dati clinici degli animali con dermatite atopica selezionati sono riportati in Tabella I. Eventuali deviazioni dal protocollo durante lo studio sono state ritenute causa di esclusione dal medesimo.

Le visite previste erano: visita di selezione (VS), visita d'inclusione (V0), visita di controllo il giorno 30 (V30) e il giorno 90 (V90).

La prima visita o di selezione (VS) serviva a selezionare i pazienti da includere nello studio. Se il cane visitato rientrava già nei criteri d'inclusione si

TABELLA I

Caratteristiche cliniche dei pazienti con dermatite atopica inseriti nello studio.

Legenda: m: maschio, f: femmina;
fs: femmina sterilizzata

Razza	Età	Sesso
Pastore Tedesco	5	m
Cocker spaniel	9	fs
Bulldog Francese	6	fs
West highland white terrier	8	fs
Pit bull	8	f
West highland white terrier	1,6	m
Shi tzu	6	fs
Yorkshire terrier	8	fs

passava direttamente alla metodologia di accettazione V0 (visita al giorno zero). In tale occasione era compilata la scheda clinica con i dati dell'animale, il peso, la dose del farmaco, il CADESI (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index) per la valutazione delle lesioni cutanee^{15,16,17,18,19} e la VAS (Visual Analogic Scale) per quella del prurito²⁰. A V30 e V90 si raccoglievano su identica scheda gli stessi dati della V0. La dose di ciclosporina A per ogni paziente è stata di 5 mg/kg/die (range dose 4-7 mg/kg/die) per via orale per il primo mese (V0-V30), poi a giorni alterni fino a V90.

Prelevi e analisi dei campioni ematici

A ogni visita clinica si è effettuato prelievo ematico di 2 ml stoccato in una provetta con EDTA per i cani con CAD. Un unico prelievo è stato eseguito agli animali utilizzati come gruppo di controllo. I campioni sono stati inviati presso il servizio di citometria a flusso laboratorio del Dipartimento di Patologia Animale Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria dell'Università di Milano, entro le 24 ore dal prelievo. Al fine di determinare il numero di linfociti totali per ogni campione è stato eseguito un esame emocromocitometrico completo mediante analizzatore ematologico automatizzato laser (Sysmex XT-2000iV) ed è stato fatto uno striscio, poi colorato con *May Grünwald-Giemsa* per confermare la formula leucocitaria prodotta automaticamente dallo strumento.

La percentuale di linfociti CD4+ e CD8+ è stata valutata su un'aliquota di 500 ml di sangue in EDTA, sulla quale gli eritrociti sono stati rimossi mediante lisi chimica con 7 ml di soluzione lisante contenente cloruro di ammonio (8%). A lisi avvenuta, la provetta è stata centrifugata a 1100 rpm per 8 minuti a 7°C e, rimosso il surnatante, sono stati effettuati due lavaggi del campione, aggiungendo circa 7 ml di PBS 1x con sodio azide, centrifugando ed eliminando il surnatante a ogni la-

vaggio. Al termine di tali procedure al campione, contenente unicamente una sospensione di leucociti, è stata aggiunta una quantità di soluzione tamponata per colture cellulari contenente amminoacidi e vitamine (RPMI 1640) con aggiunta di 5% di siero fetale di vitello e 0,2% di sodio azide, tale da ottenere una concentrazione di circa 10.000 cellule/ml. La presenza di siero fetale nella soluzione permette la saturazione dei siti di legame aspecifico per gli anticorpi sulle membrane delle cellule (blocking). Per la determinazione delle cellule CD4+ e CD8+, 50 ml della sospensione cellulare sono stati posti in due provette, in una delle quali sono stati posti anche gli anticorpi CD4-fitc (clone YKIX302.9, Serotec, Oxford, UK) e CD8-pe (clone YCATE55.9, Serotec, Oxford, UK). Dopo incubazione di 20 minuti a 4°C, le cellule sono state sottoposte a due lavaggi consecutivi con 200 ml di PBS 1x. Infine, le cellule sono state risospese con 500 ml di PBS 1x. I campioni sono infine stati valutati tramite un citometro a flusso (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, California) ed analizzate con il software specifico Cell Quest²¹. L'analisi è stata condotta identificando sul grafico morfologico (citogramma) la nuvola dei linfociti ed escludendo le cellule di altra natura (granulociti e monociti) dall'analisi. La percentuale di linfociti CD4+ e CD8+ è stata calcolata valutando le percentuali di cellule, presenti nella nuvola dei linfociti che emettono fluorescenza verde (tipica del fluorocromo FITC) e giallo-arancio (tipica del fluorocromo PE) rispettivamente. Infine è stato calcolato il rapporto tra le percentuali di linfociti CD4+ e CD8+.

Analisi statistica

La valutazione statistica dei parametri CADESI, VAS e rapporto CD4+/CD8+ è stata effettuata mediante software statistico (SPSS17) ad ogni visita. La differenza nella media dei valori di CADESI e del rapporto CD4+/CD8+, che avevano distribuzione normale, è stata valutata tramite ANOVA per analisi ripetute; la differenza nella media dei valori di VAS, che non avevano distribuzione normale, è stata valutata tramite test non parametrico per misure ripetute (Friedman test). I prelievi ematici del gruppo di controllo sono stati analizzati tramite test Mann - Whitney U per la valutazione della differenza nella media per dati non parametrici indipendenti, perché i valori dei controlli sani non avevano distribuzione normale. Per tutti i test sono stati considerati significativi valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

Le medie del CADESI erano 110 (95% intervallo di confidenza 56,82-163,18) a V0, 71,25 (95% intervallo di confidenza 46,73-95,77) a V30 e 38 (95% intervallo di confidenza 21,88-54,12) a V90;

la differenza era statisticamente significativa (ANOVA $p=0,001$) tra tutte le visite (Figura 1 e 2; Grafico 1). Le medie della VAS erano rispettivamente 6,25 (95% intervallo di confidenza 4,93-7,57) a V0, 4,25 (95% intervallo di confidenza 2,93-5,57) a V30 e 2,13 (95% intervallo di confidenza 0,91-3,34) a V90, con differenza statisticamente significativa (Friedman test $p=0,001$) tra i tre controlli (Grafico 2).

Le medie del rapporto CD4+/CD8+ sono risultate 2,06 (95% intervallo di confidenza 1,02-3,09) a V0, 1,67 (95% intervallo di confidenza 0,84-2,51) a V30 e 1,70 (95% intervallo di confidenza 1,16-2,23) a V90: la differenza non risultava statisticamente significativa (ANOVA: $p=0,694$) tra V0, V30 e V90. Il gruppo di controllo aveva una media del rapporto CD4+/CD8+ di 2,07 (95% intervallo di confidenza 0,99-3,15): questo valore non risultava statisticamente diverso da quello dei soggetti con CAD a V0 ed alle visite successive (Mann - Whitney U: $p=0,834$) (Grafico 3).

DISCUSSIONE

La dermatite atopica canina (CAD) è una malattia dermatologica cronica che comporta il trattamento

medico del paziente a vita. La dermatite atopica è stata inizialmente definita come una malattia cutanea pruriginosa infiammatoria con predisposizione genetica, aspetti clinici caratteristici e associata alla sintesi di anticorpi della classe IgE più frequentemente diretti nei confronti di allergeni ambientali^{22,23}. Nel 2006, l'*international task force* ha aggiornato la definizione della CAD, definendola una "sindrome" clinica indotta da vari fattori con produzione di IgE verso allergeni sia ambientali sia alimentari, associata o meno a reazione allergica al cibo^{22,23,24,25}. L'età media d'insorgenza è 1-3 anni, con possibilità di eventi precoci a 6 mesi o in animali anziani¹⁷; non è stata dimostrata una predisposizione di genere, mentre alcune razze sembrano maggiormente esposte al rischio^{17,26,27,28,29}. Nel nostro studio, l'età media dei pazienti era 6,45 anni, ma questo dato è da riferirsi al momento della diagnosi e all'inizio della terapia specifica, non all'insorgenza dei sintomi della malattia che nei cani esaminati risaleva mediamente ai 2-3 anni precedenti (dati non mostrati). Nel gruppo esaminato sembra esserci una maggiore predisposizione del sesso femminile (6/8) e soprattutto delle femmine sterilizzate (5/8) e la razza più rappresentata era il West Highland White Terrier (2/8), ma il numero esiguo di pazienti non consente di fare ulteriori considerazioni in merito.



FIGURA 1 - Cane meticcio con dermatite atopica al giorno 0 (V0). Sono presenti eritema, alopecia, croste ed iperpigmentazione della cute.



FIGURA 2 - Lo stesso paziente al giorno 90 (V90) dall'inizio della terapia con ciclosporina. Le lesioni dermatologiche sono completamente in remissione.

Nella CAD, il segno clinico principale è il prurito che può essere inizialmente stagionale e, in seguito, periannuale. Questo può peggiorare per effetto sommatorio se sono presenti infezioni cutanee microbiche^{17,30}. Tutti i cani nello studio sono stati sottoposti a trattamento con ciclosporina dopo un periodo di terapia antimicrobica per le infezioni secondarie e di trial dietetico ipoallergenico, per valutare il prurito primariamente associato alla CAD.

Nel 2003, è stato introdotto il CADESI (*Canine Atopic Dermatitis Extent Severity Index*), un indice di variazione oggettiva per le lesioni cliniche in corso di dermatite atopica del cane, modificato e aggiornato recentemente, per consentire al veterinario di monitorare in modo oggettivo la gravità della malattia, grazie all'assegnazione di un punteggio lesionale^{16,18,19}. Lo schema, se adeguatamente redatto, consente di valutare anche i minimi miglioramenti del cane sottoposto alla terapia medica. Un'altra metodica schematica è la VAS (*Visual Analogic Scale*) per il prurito²⁰, un metodo di valutazione soggettiva, dedicato principalmente al proprietario. Quest'ultima consente di monitorare bene anche la percezione clinica dei miglioramenti da parte del proprietario, il quale, nella maggior parte dei casi, non è in grado di giudicare il miglioramento e/o peggioramento lesionale dermatologico. Nel presente studio, sia CADESI sia VAS per il prurito sono state utilizzate ed hanno consentito di valutare in modo preciso la significativa riduzione dei sintomi clinici, durante il periodo di studio della terapia con CsA, come evidenziato dai risultati dei Grafici 1 e 2, in accordo con precedenti studi sull'uso della CsA in corso di dermatite atopica nel cane^{1,17,31}.

La complessità della malattia comporta la necessità di adottare strategie terapeutiche multiple, come per esempio, un'immunoterapia specifica, un accurato controllo degli ectoparassiti, la ricostruzione della barriera cutanea di protezione, la terapia antibiotica e/o antifungina, associazioni tra loro, ecc.^{25,32,33,34}. Qualora si intraprenda la terapia sistemica, tra i farmaci registrati considerati efficaci per bloccare la risposta immunitaria allergica, la CsA è usata da anni con successo. Questo farmaco induce la diminuzione dell'IL-2, la citochina responsabile principale della stimolazione della risposta immunitaria in corso di CAD¹.

La valutazione diretta delle citochine bersaglio di questo farmaco può essere di difficile attuazione e costosa, soprattutto in medicina veterinaria, a causa della scarsità di anticorpi specifici, validati per l'uso nel cane. In alternativa, l'effetto sul sistema immunitario si può valutare in modo indiretto tramite lo studio delle popolazioni linfocitarie, in particolare dei linfociti T CD4+ e CD8+. A questo scopo, un utile strumento è la citofluorimetria. Nonostante i costi elevati delle attrezzature e dei reagenti, questa tecnica si sta diffondendo sempre

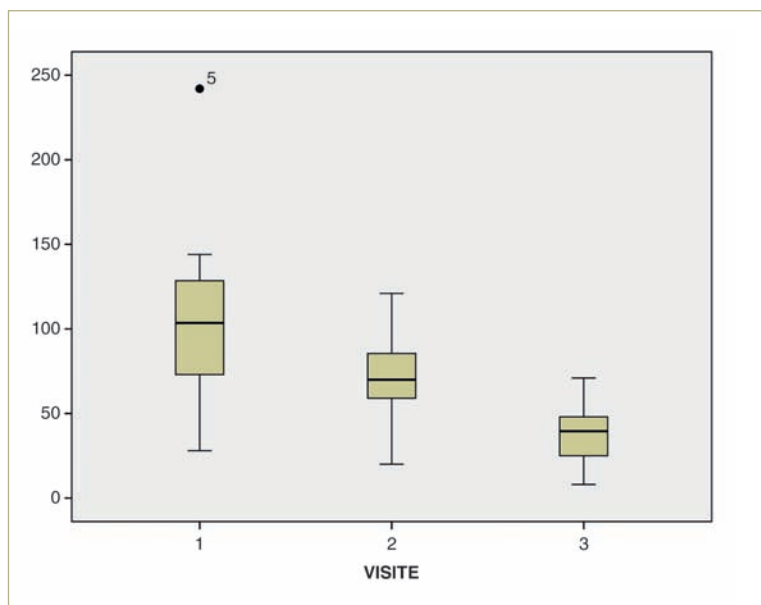


GRAFICO 1 - Valori del CADESI a V0, V30 e V90 nei cani con dermatite atopica in terapia con ciclosporina. I blots mostrano la diminuzione progressiva delle lesioni dermatologiche valutate con il CADESI.

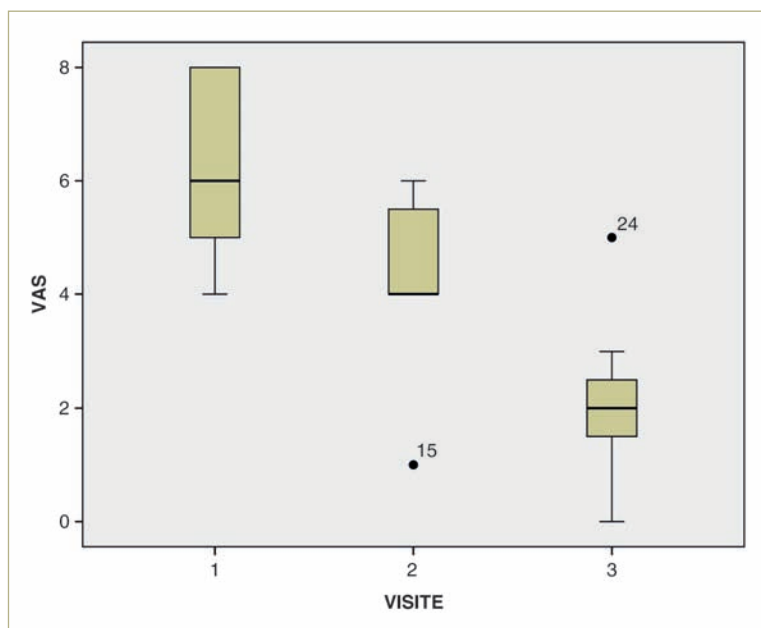


GRAFICO 2 - Valutazione della VAS nei cani con dermatite atopica in trattamento con ciclosporina a V0, V30 e V90. I blots mostrano la progressiva diminuzione del prurito osservato dai proprietari nei cani in terapia.

più anche in medicina veterinaria, in modo particolare per la valutazione del sistema immunitario e per la diagnosi e la tipizzazione delle neoplasie ematopoietiche: attraverso l'uso di anticorpi monoclonali è, infatti, possibile identificare e quantificare le diverse popolazioni presenti in una sospensione cellulare^{7,21}. Per la valutazione del rapporto CD4+/CD8+, in particolare, è sufficiente un campione di sangue periferico in EDTA, che deve essere processato entro 24 ore dal prelievo per

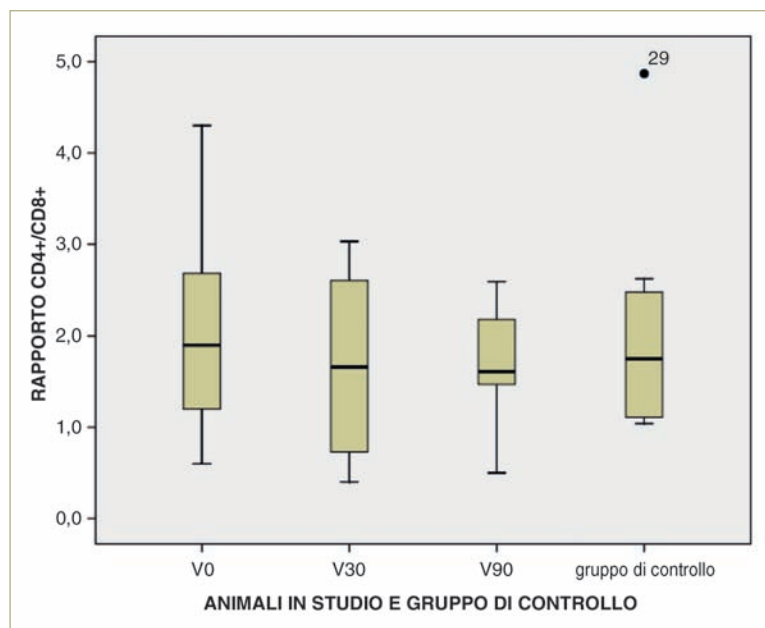


GRAFICO 3 - Valutazione del rapporto CD4+/CD8+ nei cani con dermatite atopica prima (V0) e durante il trattamento con CsA (controlli a V30 e V90), paragonati al gruppo di controllo.

avere una qualità ottimale dei risultati: questo rappresenta un notevole vantaggio per il clinico, in quanto il campionamento è semplice e non vi sono particolari tecniche di trattamento e conservazione. In laboratorio, le cellule in sospensione sono messe a contatto con anticorpi monoclonali legati a fluorofori e analizzate tramite strumenti e software specifici che identificano le diverse popolazioni in funzione di dimensione e complessità delle cellule, e registrano la percentuale di positività e l'intensità di espressione per ogni anticorpo utilizzato³⁵.

In medicina umana esistono numerosi studi sul rapporto CD4+/CD8+ nella dermatite atopica^{8,9,10,11,36} e i dati riferiscono che nei bambini con questa malattia, sottoposti a trattamento con ciclosporina, si ha una diminuzione del CD4+, mentre il CD8+ resta stabile⁸; altri invece non mostrano variazioni significative di CD4+ e CD8+⁶. Sfortunatamente questi studi forniscono risultati spesso contraddittori. Questa differenza sembra da attribuirsi alla complessità delle variazioni immunologiche della malattia, piuttosto che a differenze di disegni sperimentali. In dermatologia canina, Breathnach et al.³⁷ hanno eseguito la valutazione del rapporto CD4+/CD8+ nei cani con pododermatiti. Nei pazienti presi in esame, indipendentemente dalla gravità delle lesioni podaliche, non vi erano variazioni statisticamente significative, anche quando paragonati al gruppo di controllo di cani sani³⁷. È interessante ricordare invece, che alcuni lavori seppur non recenti, hanno riscontrato alterazioni significative del rapporto CD4+/CD8+ in cani di razza Pastore Tedesco affetti da demodicosi o da piodermite profonda e in cani con infezione da *Ma-*

lassezia pachydermatis e dermatite atopica^{11,38,39}. I nostri risultati rilevano invece come il rapporto CD4+/CD8+ non sia differente in cani sani e cani con CAD prima del trattamento. Di conseguenza, se paragoniamo i dati emersi dal nostro studio con quelli di Morris et al sui cani con CAD e dermatite da *Malassezia*, si può ipotizzare che le infezioni giochino un ruolo più importante nella variazione del rapporto CD4+/CD8+, rispetto alla malattia allergica da sola. È inoltre interessante notare che la terapia con CsA non modifica in modo significativo questi valori, mentre si verifica comunque un miglioramento clinico con remissione dei sintomi della malattia. Tuttavia l'assenza di alterazioni quantitative del rapporto CD4+/CD8+ non consente di escludere il ruolo patogenetico di altre sottopopolazioni quali i Treg né l'eventuale sbilanciamento del rapporto Th1/Th2 la cui valutazione in condizioni cliniche rimane comunque difficoltosa e non standardizzata.

In base ai risultati di questo studio, la somministrazione di CsA migliora le condizioni cliniche dei soggetti affetti da CAD (indice CADESI) e diminuisce il prurito osservato dai proprietari (indice VAS), senza modificare il rapporto CD4+/CD8+. Tuttavia questi dati sono stati ottenuti da un numero molto limitato di soggetti (8 cani), e andrebbero quindi verificati su una più ampia casistica.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano Novartis HA (Origgio, Varese, Italia) per avere fornito il supporto economico per l'acquisto dei reagenti per la valutazione del rapporto CD4+/CD8+ in citofluorimetria.

Parole chiave

Dermatite atopica canina, rapporto CD4+/CD8+, ciclosporina.

■ CD4+/CD8+ ratio in atopic dogs before and after treatment with ciclosporin A: preliminary results

Summary

Ciclosporin is generally used in veterinary dermatology for the treatment of canine atopic dermatitis (CAD), due to its selectively ability to block production of inflammatory cytokine. CD4+/CD8+ ratio is considered useful to evaluate immune system for the indirect correlation with specific lymphocytic immune response (Th1/Th2 ratio). The aim of this prospective study was to evaluate CD4+/CD8+ ratio in atopic dogs before and after treatment with ciclosporin. Eight dogs with CAD were included and citofluorometry was performed on day 0 (V0), day 30 (V30) and 90 (V90) from beginning CsA therapy. CADESI (Canine Atopic Dermatitis Extend Severity In-

dex) and VAS (Visual Analogic Scale) were assessed at the same time. Healthy dogs were used as control group for CD4+/CD8+ ratio evaluation. Statistical analysis was performed with SPSS17 software: ANOVA for repeated measures was used for CADESI and CD4+/CD8+ ratio, Friedman test for VAS difference analysis. P value<0-05 was considered statistically significant. Results

showed a p-value=0.001 for CADESI and VAS, a p-value=0.694 for CD4+/CD8+ ratio. Based on results, CsA statistically decreases CADESI and VAS index improving clinical condition of affected dogs, but do not modify CD4+/CD8+ ratio.

Key words

Canine atopic dermatitis, CD4+/CD8+ ratio, ciclosporin.

BIBLIOGRAFIA

1. Robson D: Review of the properties and mechanisms of action of cyclosporine with an emphasis on dermatological therapy in dogs, cats and people. *The Veterinary Records* 152: 768-772, 2003.
2. Fellman CL, Stokes JV, Archer TN, et al. Cyclosporine A affects the in vitro expression of T cell activation-related molecules and cytokines in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 140: 175-180, 2011.
3. Rao A, Luo C, Hogan PG: Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Rev. Immunol* 15: 707-747, 1997.
4. Kobayashi T, Momoi Y, Iwasaki T: Cyclosporine A inhibits the mRNA expression of IL-2, IL-4 and TNF- γ , but not TNF- α in canine mononuclear cells. *J Vet Med Sci* 69 (9): 887-892, 2007.
5. Maeda S, Tsuchida H, Shibata S, et al.: Expression analysis of CCL27 and CCL28 mRNA in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *J Vet Med Sci* 70 (1): 51-55, 2008.
6. Tizard IR: Helper T cells and their response to antigen. In: *Veterinary Immunology: and introduction* Tizard IR ed, W.B Saunders Philadelphia. 2000: 98-109.
7. Farrell AM, Antrobus P, Simpson D, et al.: A rapid flow cytometric assay to detect CD41 and CD81 T-helper (Th) 0, Th1 and Th2 cells in whole blood and its application to study cytokine levels in atopic dermatitis before and after cyclosporin therapy. *British J Dermatol* 144: 24-33, 2001.
8. Lee SY, Shim JY, Kim JH, et al.: Cyclosporine treatment decrease the percentage of cutaneous lymphocyte antigen (CLA)+ CD4+ T cells in children with severe atopic dermatitis. *Allergy Net* 59: 1129-1130, 2004.
9. Hijnen DJ, Haeck I, Van Kraats AA, et al.: Cyclosporin A reduces CD41+CD25+ regulatory T-cell numbers in patients with atopic dermatitis *J Allergy Clin Immunol* 124 (4): 856-858, 2009.
10. Brandt C, Pavlovic V, Radbruch A, et al.: Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis. *Allergy* 64: 1588-1596, 2009.
11. Morris DO, Clayton DJ, Drobatz KJ, et al.: Response to Malassezia pachydermatis by peripheral blood mononuclear cells from clinically normal and atopic dogs. *Am J Vet Res* 63: 358-62, 2002.
12. Comazzi S, Gelain ME, Spagnolo V, et al.: Flow cytometric patterns in blood from dogs with non-neoplastic and neoplastic hematologic diseases using double labeling for CD18 and CD45. *Vet Clin Pathol* 35 (1): 47-54, 2006.
13. Izci C, Celik I, Alkan F, et al.: Histologic characteristics and local cellular immunity of the gland of the third eyelid after topical ophthalmic administration of 2% cyclosporine for treatment of dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Am J Vet Res* 63 (5): 668-694, 2002.
14. Gilber BC, Andrews J, Wilkie DA, et al.: Cellular immunity in dogs with keratoconjunctivitis sicca before and after treatment with topical 2% cyclosporine. *Vet Immunol Immunopathol* 49 (3): 199-208, 1995.
15. Olivry T: International Task Force of Canine Dermatitis. New diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 21 (1): 123-126, 2010.
16. Olivry T, Marsella R, Iwasaki T, et al.: Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 18: 78-86, 2007.
17. Prelaud P, Power HT: Dermatite atopica canina. In *Guaguère E. & Prelaud P. Guida pratica di dermatologia canina*. Kallianxis Merial; 233-258, 2006.
18. Olivry T, Marsella R, Iwasaki T, Mueller R: International Task Force On Canine Atopic Dermatitis. Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 18 (2): 78-86, 2007.
19. Olivry T, Mueller R, Nuttall T, et al.: International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. Determination of CADESI-03 thresholds for increasing severity levels of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 19 (3): 115-119, 2008.
20. Hill PB, Lau P, Rydniczek J: Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. *Vet Dermatol* 18 (5): 301-308, 2007.
21. Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F, et al.: Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry *Vet Immunol Immunopathol* 121 (3-4): 179-188, 2007.
22. Halliwell R: Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol Immunopathol* 114: 2007-8, 2006.
23. Favrot C, Steffan J, Seewald W, et al.: A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 21 (1): 23-31, 2010.
24. Halliwell REW: The immunopathogenesis of allergic skin diseases of dog and cat. *EJACP* 213-218, 2009.
25. Hensel P: Nutrition and skin diseases in veterinary medicine. *Clin Dermatol* 28(6): 686-93, 2010.
26. Marsella R: Canine Atopic Dermatitis: What's New? *Compend Contin Educ Vet* 32(2): E1-4, 2010.
27. Jaeger K, Linek M, Power HT, et al.: Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Vet Dermatol* 21(1): 118-122, 2010.
28. Meury S, Molitor V, Doherr MG, et al.: Role of the environment in the development of canine atopic dermatitis in Labrador and golden retrievers. *Vet Dermatol* 22 (4): 327-334, 2011.
29. Wilhelm S, Kovalik M, Favrot C: Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 22 (2): 143-149, 2010.
30. McEwan NA, Mellor D, Kalna G: Adherence by Staphylococcus intermedius to canine corneocytes: a preliminary study comparing noninflamed and inflamed atopic canine skin. *Vet Dermatol* 17 (2): 151-154, 2006.
31. Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, et al.: Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol* 21 (3): 233-248, 2010.
32. Scott DW, Miller WH, Griffin GE: Skin immune system and allergic diseases. In *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001, 543-666.
33. Marsella R, Samuelson D: Unravelling the skin barrier: a new paradigm for atopic dermatitis and house dust mites. *Vet Dermatol* 20 (5-6): 533-540, 2009.
34. Shimada K, Yoon JS, Yoshihara T, et al.: Increased Transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 20 (5-6): 541-546, 2009.
35. Weiss DJ: Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Vet Clin Pathol* 31 (2): 72-82, 2002.
36. Baumgrass R, Brandt C, Wegner F, et al.: Low-dose, but not high-dose, cyclosporin A promotes regulatory T-cell induction, expansion, or both. *J Allergy Clin Immunol* 126 (1): 183-184, 2010.
37. Breathnach RM, Baker KP, Quinn PJ, et al.: Clinical, immunological and histopathological findings in a subpopulation of dogs with pododermatitis. *Vet Dermatol* 16 (6): 364-72, 2005.
38. Caswell JF, Yager JA, Parker JP, et al.: A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histological lesions of canine demodicosis. *Vet Pathol* 34: 279-87, 1997.
39. Denerolle P, Bourdoiseau G, Magnol JP, et al.: German shepherd deep pyoderma: a prospective study of 23 cases. *Vet Dermatol* 9: 242-248, 1998.