

# Uso della citometria a flusso nello studio delle popolazioni linfocitarie circolanti con particolare riferimento al ruolo dei linfociti T regolatori e in corso di dermatite atopica



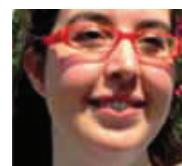
Massimo Beccati\*,  
Med Vet, PhD, MSc,  
CertGP Med. Felina,  
Spec. pat. piccoli  
animali



Valeria Martini†,  
Med Vet, PhD



Stefano Comazzi†,  
Med Vet,  
Dipl ECVCP



Natalia Fantoni‡,  
Med Vet, Res ECVJ



Luisa Cornegiani†,  
Med Vet, PhD,  
Dipl ECVJ

La dermatite atopica rappresenta una delle patologie più frequenti in ambito dermatologico canino. L'eziopatogenesi a oggi, come in umana, non è del tutto compresa; si concorda che si tratti di una sindrome a eziologia multifattoriale, dove influenze ambientali, genetiche e immunitarie concorrono a innescare e perpetuare tale malattia. Ultimamente si è affermata l'ipotesi che alla base dei disturbi immunitari ci sia un'alterata cascata di attivazione dei linfociti T helper (Th) e nel particolare un'inadeguata funzionalità dei linfociti regolatori (Treg). Un'alterazione della quantità e dei meccanismi soppressivi di tali linfociti porterebbe a un disequilibrio del rapporto tra linfociti Th1 e Th2. La citofluorimetria, o citometria a flusso, è una metodica di laboratorio che permette la valutazione qualitativa e quantitativa di diversi parametri di singole cellule in sospensione. La quantificazione dei Treg con queste nuove tecniche favorisce lo studio e la conoscenza della complessa cascata immunitaria in corso di malattie allergiche.

## INTRODUZIONE

La dermatite atopica canina è una malattia cutanea infiammatoria, a predisposizione genetica, con quadri clinici caratterizzati da eritema e prurito, spesso associata a un incremento delle immunoglobuline del tipo IgE principalmente *versus* allergeni ambientali<sup>1,2</sup>. L'eziopatogenesi della dermatite atopica, seppur negli ultimi anni siano stati identificati nuovi meccanismi patogenetici, a oggi non è del tutto chiara<sup>1,2</sup>.

Come la dermatite atopica umana, quella canina è una sindrome che si manifesta in seguito all'interazione di fattori genetici individuali, influssi ambientali, ectoparassitosi concomitanti, ecc., i quali in sincronia giocano un ruolo fondamentale nel predisporre a una cascata immunitaria disregolata<sup>2</sup>. Non è ancora certo se sia un difetto della barriera cutanea a permettere un maggior ingresso di allergeni attraverso l'epidermide, innescando così la cascata immunitaria (teoria outside-inside), oppure se l'esordio della patologia parta direttamente da un'aberrante risposta del sistema immunitario (teoria inside-outside)<sup>1</sup>. L'opinione comune vede entrambe le teorie valide e coesistenti<sup>1-3</sup>.

\* Centro Medico Veterinario Veterinaria Adda, 24042 Capriate (Bergamo), Italy

† Dipartimento di scienze veterinarie e salute pubblica, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano, Italy

‡ Clinica Veterinaria S.Siro, 20151 Milano, Italy

\* Corresponding Author (addavet@libero.it)

Ricevuto: 12/12/2014  
Accettato: 15/12/2015

Mentre in passato si era data molta importanza patogenetica alle IgE, ai mastociti e ai mediatori prodotti, quali l'istamina, oggi le ricerche si stanno orientando sul ruolo fondamentale del sistema immunitario adattativo nella patogenesi della dermatite atopica<sup>1,3</sup>. Questa branca del sistema immunitario, nota anche come immunità acquisita o immunità specifica, è caratterizzata dalla peculiarità di rispondere a stimoli antigenici diversi con efficacia e specificità maggiori rispetto all'immunità innata, seppure con tempi di reazione più lenti. L'immunità adattativa si divide a sua volta in immunità umorale e cellulo-mediata. Le principali cellule che agiscono in questo tipo di risposta immunitaria sono i linfociti, a loro volta divisi in classi secondo la loro funzione.

I linfociti B sono le cellule promotrici della produzione delle plasmacellule e, in seguito, della produzione degli anticorpi; sono pertanto responsabili della risposta immunitaria umorale. I linfociti T esercitano funzioni di regolazione del sistema immunitario (T helper CD4+) e mansioni citotossiche (T helper CD8+)<sup>3</sup>. Un'altra gamma di linfociti che rientra nella risposta immunitaria è rappresentata dai linfociti natural killer (NK)<sup>3</sup>.

**La dermatite atopica canina è una malattia multifattoriale in cui il sistema immunitario adattativo svolge un ruolo fondamentale.**

I linfociti T derivano da cellule progenitrici del midollo osseo che, attraverso il torrente circolatorio, migrano nel timo<sup>3</sup>. A questo livello i linfociti sono soggetti a una complessa cascata maturativa terminante nello sviluppo dei cosiddetti cluster di differenziazione di membrana (CD), che ne determineranno la funzione. Una volta acquisiti i cluster, i linfociti T subiscono una selezione di sviluppo; molti di essi vanno incontro a morte selettiva. I linfociti sopravvissuti alle selezioni d'istocompatibilità saranno rilasciati nel torrente circolatorio dove svolgeranno diverse funzioni. Mentre i linfociti CD8+ con azione effettrice sono i linfociti T citotossici (CTL), la popolazione linfocitaria CD4+ darà in seguito sviluppo a due sottoclassi distinte, identificate come linfociti Th1, responsabili della risposta cellulo-mediata e Th2, coinvolti nella risposta umorale<sup>3</sup>. La differenziazione di un linfocita Th1 o Th2 dipende da diversi fattori tra i quali: tipologia dell'antigene, modalità di presentazione dell'antigene, caratteristiche delle cellule presentanti l'antigene (APC)<sup>3</sup>.

Nel paziente affetto da dermatite atopica, la risposta immunitaria si può dividere in due fasi. La fase acuta, tipicamente associata ad un'attivazione immunitaria di linfociti Th2 è caratterizzata dalla produzione d'interleuchine (IL), tra cui IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13<sup>1</sup>. La fase cronica è invece caratterizzata da una risposta di tipo

Th1 modulata dalla produzione di IL12 e interferone  $\gamma$ <sup>1,2</sup>. Le ricerche iniziali si sono concentrate soprattutto sullo squilibrio tra risposta Th1 e Th2; con il progredire della conoscenza è apparso evidente che altri meccanismi sono coinvolti<sup>1,2</sup>.

Tra gli aspetti ancora da chiarire è il ruolo dei linfociti T regolatori (Treg). Si tratta di una sottoclasse di linfociti T ad azione soppressiva; hanno l'importante ruolo di prevenire l'attivazione di linfociti T reattivi contro antigeni *self*, quindi potenzialmente dannosi<sup>3,4,5</sup>.

Per valutare in modo completo la funzionalità del sistema immunitario è perciò necessaria l'analisi quantitativa dell'espressione di diverse citochine, al fine di delineare la presenza dei diversi *pattern* associati alle diverse risposte immunitarie sopradescritte<sup>3</sup>.

Tale analisi può essere eseguita tramite test ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) per quantificare le proteine o tramite tecniche di biologia molecolare per quantificare l'mRNA codificante. Sfortunatamente, le tecniche ELISA presentano performance diagnostiche variabili in funzione delle citochine analizzate e del kit utilizzato, rendendo complessa l'interpretazione dei risultati e difficile il confronto tra dati ottenuti da laboratori differenti. Le tecniche di biologia molecolare, come ad esempio la PCR (*Polymerase chain reaction*) forniscono invece risultati più affidabili, ma sono più costose e richiedono un'attenta messa a punto e l'uso costante di controlli interni, fattore che incrementa ulteriormente i costi. Per questi motivi, queste tecniche sono di difficile applicazione nella pratica clinica veterinaria. Oggi le popolazioni linfocitarie canine possono essere valutate tramite la citometria a flusso<sup>6-10</sup>. Questa tecnica si sta diffondendo in medicina veterinaria, in modo particolare, per la valutazione del sistema immunitario e per la diagnosi e la tipizzazione delle neoplasie ematopoietiche; infatti, permette di identificare e quantifica-

**Lo studio delle alterazioni del sistema immunitario in corso di malattie allergiche richiede l'identificazione delle varie popolazioni cellulari coinvolte.**

re le diverse popolazioni presenti in una sospensione cellulare attraverso l'uso di anticorpi monoclonali<sup>6-10</sup>. Per la valutazione della funzionalità immunitaria, in particolare, l'attenzione è spesso posta sul rapporto CD4+/CD8+, tra linfociti T helper e T citotossici, e sulla percentuale di linfociti T ad azione regolatoria.

## I LINFOCITI T REGOLATORI (TREG) E IL LORO RUOLO NELLA DERMATITE ATOPICA CANINA

I linfociti Treg, detti anche soppressori (T suppressor), derivano da cellule progenitrici del midollo osseo che,

attraverso il torrente circolatorio, migrano nel timo<sup>3</sup>. A livello timico tali linfociti sono soggetti a una complessa cascata maturativa terminante nello sviluppo dei cosiddetti cluster di differenziazione di membrana (CD)<sup>3</sup>. Essi sono identificati, sia nell'uomo sia nel cane, dalla co-espressione sulla superficie esterna della membrana cellulare di CD4 e CD25 e nel citoplasma di FoxP3<sup>3-5</sup>. I linfociti regolatori sono numerosi e di diversa tipologia, ma in medicina veterinaria i più studiati sono stati i CD4+CD25+ e FoxP3<sup>1,4,5</sup>. La risposta nociva è direttamente tenuta sotto controllo dai linfociti CD4+CD25+ Treg e dalla IL10; il mancato o scarso funzionamento di tali cellule scatena inevitabilmente una risposta immunitaria non controllata<sup>3-5</sup>. I linfociti Treg sono coinvolti nei processi di regolazione, soprattutto in senso abrogativo, del sistema immunitario<sup>3</sup>; sopprimendo l'attivazione di altre cellule immunitarie nocive, sono un'importante "self-check" naturale nel sistema immunitario, in grado di anticipare risposte immunitarie esuberanti e protratte nel tempo. In questo modo, una volta che l'antigene è stato eliminato, limitano il danno tissutale indotto dalla cronicità dello stimolo<sup>3</sup>. Un'alterata funzionalità dei Treg è stata identificata in diverse malattie autoimmuni e allergiche<sup>5</sup>.

**I linfociti Treg, che svolgono un'azione soppressiva nei confronti delle altre classi linfocitarie, sono stati oggetto di studio sia nella dermatite atopica umana che canina.**

La reale attività e funzione dei Treg in corso di dermatite atopica canina è ancora oggetto di ricerca. In uno studio è stato confrontato il numero di linfociti T regolatori circolanti in cani sani e affetti da dermatite atopica, prima e dopo un anno d'immunoterapia allergene specifica<sup>11</sup>. Gli autori non hanno riscontrato differenze significative tra i due gruppi all'inizio dello studio, tuttavia la percentuale di linfociti ematici Treg CD4+CD25+FoxP3+ aumentava significativamente nei cani atopici a distanza di un anno dall'inizio della terapia<sup>11</sup>. Inoltre, l'incremento del numero di Treg era maggiore nei cani che avevano avuto maggior beneficio dall'immunoterapia<sup>11</sup>.

Recentemente, uno studio ha valutato la presenza e distribuzione dei Treg, definiti come CD25+ FoxP3+, nella cute di cani sani e di cani atopici, considerando sia aree lesionali che aree apparentemente normali<sup>12</sup>. Gli autori hanno riscontrato che il pattern di distribuzione dei linfociti era sovrapponibile nei cani sani e in quelli atopici, sia nella cute lesionale sia in quella alesiionale. Inoltre, non vi erano differenze nella percentuale di linfociti CD4+ CD25+FoxP3+ nei tre gruppi<sup>12</sup>. Gli autori hanno però osservato una minore per-

centuale di linfociti CD8+CD25+FoxP3+ nella cute dei cani atopici (sia in aree lesionali che alesiionali) rispetto ai cani sani<sup>12</sup>.

## LA CITOMETRIA A FLUSSO NELLA VALUTAZIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO

La citofluorimetria (CFM), o citometria a flusso, è una metodica di laboratorio automatizzata, che permette la valutazione qualitativa e quantitativa di diversi parametri di singole cellule in sospensione, incluse le dimensioni, la complessità interna e, tramite l'uso di specifici anticorpi monoclonali (mAbs), il pattern antigenico<sup>6-10</sup>.

Prima dell'impiego di questa tecnologia tali informazioni si ottenevano con esame citologico, citochimico e immunocitochimico.

Rispetto a queste tecniche, che sono comunque tutt'oggi ampiamente utilizzate in alcuni settori, la CFM presenta degli importanti vantaggi. In particolare permette: 1) una misurazione dei dati più oggettiva e ripetibile, e la loro immediata registrazione in forma elettronica; 2) la valutazione di decine di migliaia di cellule in pochi secondi; 3) la valutazione contemporanea di più parametri per ciascuna cellula, compresa l'espressione di diversi antigeni. La CFM presenta però anche un importante limite: deve essere eseguita su materiale fresco non oltre ventiquattro ore dal prelievo<sup>6</sup>.

Questa caratteristica può in alcuni casi ridurre l'applicabilità in ambito clinico e ne impedisce l'utilizzo per l'analisi di campioni di archivio.

In medicina veterinaria, la CFM è utilizzata soprattutto per la diagnosi, l'immunofenotipizzazione e la stadiazione delle neoplasie ematopoietiche del cane<sup>6-10</sup>. Tuttavia, essa può essere adibita anche ad altri scopi, inclusa la valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie e del pattern citochimico da esse espresso, allo scopo di valutare lo stato del sistema immunitario in corso di patologie infiammatorie e neoplastiche<sup>6-10</sup>.

## PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO DELLA CFM

Da un punto di vista prettamente tecnico, i campioni analizzabili tramite CFM sono costituiti da sospensioni cellulari, come sangue periferico, midollo osseo o altri liquidi biologici; anche cellule da tessuti o lesioni solide possono essere analizzate, purché opportunamente sospese in appositi terreni di coltura<sup>7</sup>.

Il campione deve quindi essere processato in funzione dell'analisi voluta. In particolare, per ottenere informazioni sui globuli bianchi presenti nel sangue, è opportuno lisare preventivamente gli eritrociti tramite apposite soluzioni. Una volta fatto ciò, le cellule sono messe in incubazione con gli anticorpi monoclonali. L'utilizzo di mAbs, permette di valutare il pattern antigenico-

co della singola cellula: l'anticorpo si legherà solo alla cellula che esprime la molecola verso cui è diretto, generando quindi un segnale luminoso che verrà letto e registrato dal citometro. Le molecole espresse e quindi il pattern antigenico varia non solo da una popolazione cellulare all'altra (per esempio, tra neutrofili e linfociti), ma anche tra i diversi gradi di maturazione della stessa cellula (precursori vs cellula matura). Tramite l'uso di mAbs è quindi possibile identificare la linea di appartenenza e lo stadio di maturazione di ogni cellula nel campione. È possibile anche analizzare l'espressione di molecole nel citoplasma delle cellule, sottoponendo preventivamente le cellule ad un processo di permeabilizzazione, che permette l'ingresso dei mAbs nella cellula<sup>7</sup>.

**La citofluorimetria (CFM), o citometria a flusso, è una metodica di laboratorio automatizzata, che permette la valutazione qualitativa e quantitativa di diversi parametri di singole cellule in sospensione.**

Una volta all'interno della macchina, ogni singola cellula è trasportata tramite un flusso laminare di acqua o di aria, secondo il modello di citometro, in una camera di lettura. Qui le cellule passano in fila ordinata, separate l'una dall'altra, e sono colpite dalla luce di un laser. Il citometro è equipaggiato con una serie di schermi che registrano informazioni diverse: uno schermo legge l'ampiezza del cono d'ombra che si forma al di là della cellula e che è proporzionale alle dimensioni della cellula stessa; un secondo legge la quantità della luce del laser che viene rifratta a 90° e che è proporzionale alla complessità interna delle cellule (a sua volta influenzata soprattutto dalla forma del nucleo). Altri schermi sono equipaggiati con filtri specifici e registrano i segnali luminosi emessi dagli anticorpi monoclonali fluorescenti. Il numero di laser e di schermi filtranti varia in funzione del modello di citometro, permettendo l'uso contemporaneo di un numero sempre maggiore di anticorpi specifici<sup>6,9,11</sup>.

Le informazioni registrate dai vari schermi sono quindi digitalizzate e rappresentate tramite grafici diversi, secondo le preferenze dell'operatore. Inoltre, è possibile ottenere informazioni sulla percentuale di cellule nel campione con determinate caratteristiche.

Per quanto riguarda il rapporto CD4+/CD8+ e percentuale di Treg, questi sono calcolati restringendo le analisi ai soli linfociti, che si distinguono tra i globuli bianchi perché hanno piccole dimensioni e ridotta complessità cellulare (nucleo tondo con scarso citoplasma senza granuli).

Come nella rappresentazione grafica della figura 1, le cellule acquisite possono essere rappresentate in grafici mor-

fologici (Fig. 1: A, B, C) o in istogrammi (Fig. 1: D), in funzione di dimensioni (FSC-Height), complessità interna (SSC-Height) o intensità di fluorescenza.

## DISCUSSIONE

Le odierne tecniche per la valutazione delle disfunzioni del sistema immunitario implicano la quantificazione di determinate citochine con valutazione del rapporto tra i linfociti Th1 e Th2.

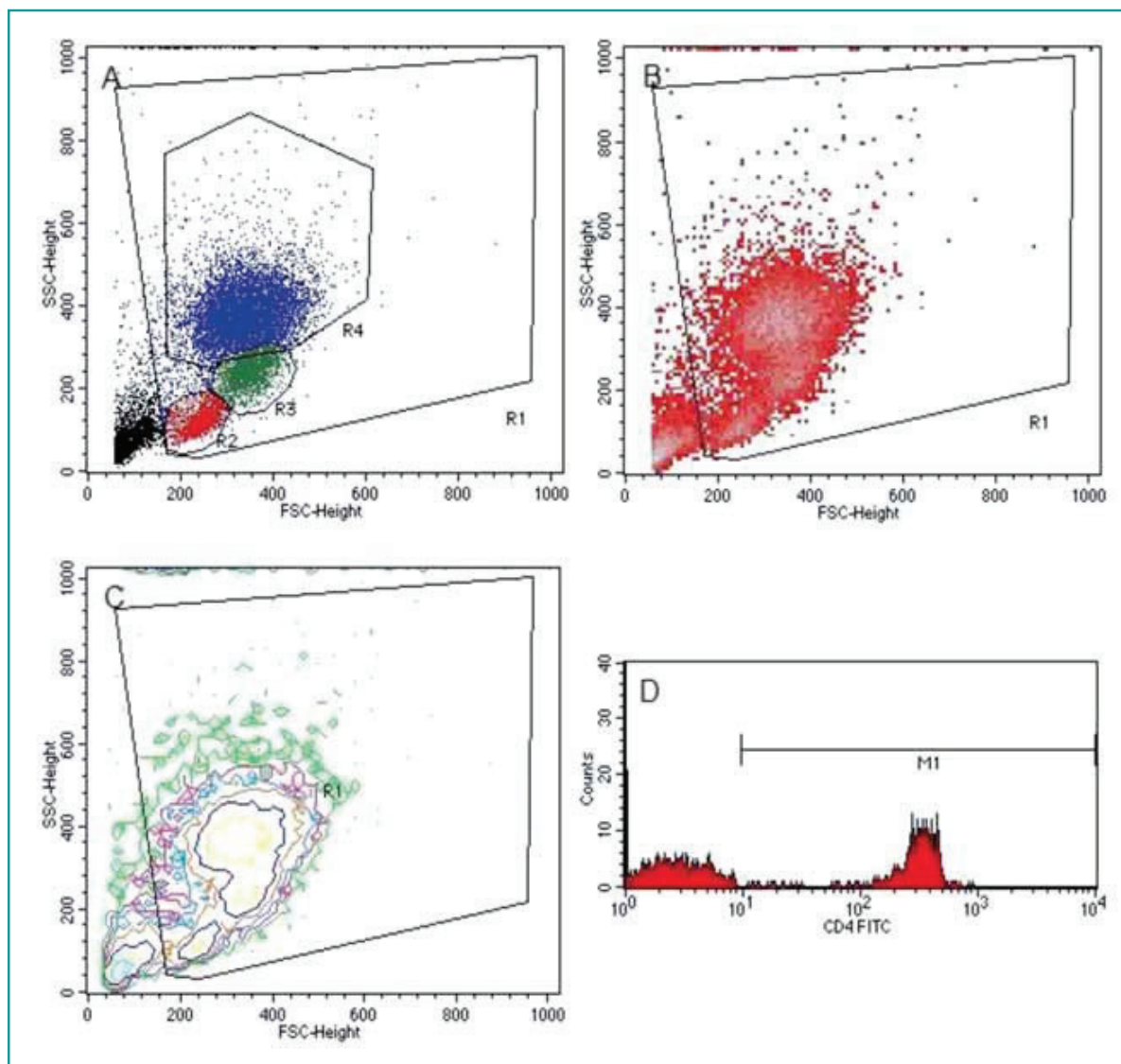
Con la citometria a flusso è possibile quantificare le differenti popolazioni cellulari sospese in una soluzione<sup>6</sup>. Vi è quindi la possibilità di misurare le quantità e la tipologia dei linfociti circolanti, tra cui anche i linfociti regolatori CD4+CD25+FoxP3+<sup>3,4</sup>. La disregolazione nella produzione dei linfociti T regolatori in corso di dermatite atopica potrebbe innescare una cascata immunitaria anomala sfociante in risposte immunitarie aberranti o eccessive.

Gli studi sino ad ora effettuati hanno portato risultati contrastanti. Infatti, non sono emerse differenze significative nella quantità ematica di linfociti T regolatori tra cani sani e cani affetti da dermatite atopica<sup>11</sup>, contrariamente a quanto osservato in alcuni studi effettuati in medicina umana, in cui nel torrente circolatorio di pazienti affetti da dermatite atopica sono stati identificati Treg in quantità più elevata rispetto ai pazienti sani<sup>13</sup>. Tuttavia, i cani sottoposti a immunoterapia, incrementavano notevolmente la percentuale di linfociti ematici Treg a distanza di un anno dall'inizio della terapia<sup>11</sup>. In un altro studio a livello cutaneo sono state osservate differenze significative nella percentuale di cellule FoxP3 positive<sup>12</sup>. È possibile perciò che la quantità di Treg circolanti nel sangue periferico non rifletta quella presente a livello cutaneo. Un altro aspetto da considerare è che questo tipo di studi, sebbene fondamentali, non forniscono informazioni sull'attività delle cellule, ma solo sulla loro presenza. Inoltre, recentemente è stato evidenziato come i due antigeni CD25 e FoxP3 non siano sufficienti per distinguere le cellule linfoidi ad azione regolatrice, in quanto alcune cellule possono esprimere questi antigeni transitoriamente<sup>12</sup>.

**Sebbene gli studi effettuati abbiano ottenuto risultati contrastanti, i Treg sembrano avere un ruolo nella patogenesi della dermatite atopica.**

Nei soggetti atopici affetti da infezioni batteriche secondarie, i Treg perdono la loro peculiarità immunoregolatrice/immunosoppressiva; questo sembra confermare quanto e come le infezioni batteriche possano influenzare ed incrementare lo sviluppo della dermatite atopica<sup>12</sup>.





**Figura 1** - Rappresentazione grafica di dati ottenuti con citometria a flusso su sangue periferico di cane sano. Nei grafici morfologici (A, B, C) è possibile disegnare un *gate* per escludere piastrine e detrito dalle analisi (R1). A: *dot plot*, ogni punto rappresenta una cellula. Si possono identificare tre popolazioni cellulari distinte: linfociti piccoli e poco complessi (R2), monociti con dimensioni e complessità medie (R3) e polimorfonucleati di medie dimensioni ma ad elevata complessità (R4). B: *density plot*, a colore più chiaro corrisponde maggior concentrazione di cellule. C: *contour plot*, linee di diverso colore circondano aree a diversa concentrazione cellulare. D: istogramma rappresentante solo i linfociti, una parte dei quali è positivo a CD4 (M1).

La soppressione dei Treg in studi eseguiti sui topi e nell'uomo ha alterato la produzione di citochine regolatrici come le IL 10 e il TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor)<sup>12</sup>. Concludendo, ad oggi, non si è fatta luce in maniera esaustiva sulla cascata immunitaria nei cani affetti da dermatite atopica. La dermatite atopica è una sindrome a eziologia multifattoriale, con un interessamento del sistema immunitario globale e non solo delle IgE, mastociti e istamina. Resta però appurato che i linfociti regolatori giocano un ruolo determinante nella gestione del sistema immunitario. In conclusione, i linfociti Treg sono una popolazione di cellule specializ-

zate nel mantenere l'omeostasi e la tolleranza immunitaria periferica e studi recenti hanno confermato il loro ruolo nella soppressione dell'attivazione linfocitaria antigene-indotta. Di conseguenza si può ipotizzare che un anomalo funzionamento dei linfociti T regolatori porti conseguentemente a una cascata immunitaria alterata e favorente sia l'attivazione di una risposta allergica che la sua perpetuazione.

La metodica laboratoristica della citometria a flusso, potrebbe essere di ausilio nella valutazione quantitativa e qualitativa delle popolazioni linfocitarie coinvolte, anche in corso di malattia allergica.

## PUNTI CHIAVE

- I linfociti Tregolatori (Treg) esercitano la funzione di modulazione del sistema immunitario e mansioni citotossiche assieme ai linfociti natural killer.
- La disregolazione nella produzione dei linfociti Treg in corso di dermatite atopica potrebbe innescare una cascata immunitaria anomala sfociante in risposte immunitarie aberranti o eccessive.
- La citometria a flusso, specificatamente in medicina veterinaria, è oggi applicata per la valutazione dello stato del sistema immunitario.
- La quantificazione dei Treg con questa nuova tecnica permette lo studio della complessa cascata immunitaria in corso di malattie allergiche.
- I linfociti Treg sembrano avere un ruolo nella patogenesi della dermatite atopica.

## Use of flow cytometry in the study of circulating lymphocyte populations with particular reference to the role of regulatory T lymphocytes and atopic dermatitis

*Canine atopic dermatitis (CAD) is one of the most common dermatologic diseases in dogs. Its etiopathogenesis is not completely clear; it is currently accepted that CAD is a multifactorial syndrome, where environmental, genetic and immunologic factors play a role in development and progression of the disease. Recently, an abnormal activation and function of T helper (Th) contributor to immunologic dysfunction has been speculated. It is supposed that variations in number or function of Treg would lead to an altered relationship between Th1 and Th2 lymphocytes. This hypothesis would explain part of CAD etiopathogenesis. Flow cytometry is a technique that allows a qualitative and quantitative investigation of cells suspended in a solution. This technique can be used to study lymphocytes populations, including Treg, to investigate the complex immune cascade in allergic diseases.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Miller WH, Griffin CE, Campbell K.L. Canine Atopic Dermatitis. In: Muller and Kirk's small animal dermatology. Philadelphia:W.B. Saunders Co, 2013, pp. 365-392.
2. Marsella R, Sousa CA, Gonzales AJ *et al*: Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. Journal of the American Veterinary Medical Association 241:194-207, 2012.
3. Day JM. Fondamenti di immunologia. In: Allergologia ed immunologia clinica del cane e del gatto. Torino: UTET, 2002, pp. 9-46.
4. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. Nat. Immunology 4: 330-336, 2003.
5. Pinheiro D, Singh Y, Grant CR *et al*: Phenotypic and functional characterization of a CD4+ CD25high FOXP3high regulatory T-cell population in the dog. Immunology 132: 111-122, 2011.
6. Tarrant JM. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. The Veterinary Journal 170: 278-288, 2005.
7. Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. The Veterinary Journal 188: 149-155, 2011.
8. Reggeti F, Bienze D. Flow cytometry in veterinary oncology. Veterinary pathology 48: 223-235, 2011.
9. Joetzke AE, Eberle N, Nolte I *et al*: Flow cytometric evaluation of peripheral blood and bone marrow and fine-needle aspirate samples from multiple sites in dogs with multicentric lymphoma. American Journal of Veterinary Research 73: 884-893, 2012.
10. Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F *et al*: Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. Veterinary Immunology and Immunopathology 121: 179-188, 2007.
11. Keppel KE, Campbell KL, Zuckerman FA *et al*: Quantization of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. Veterinary Immunology and Immunopathology 123: 337-344, 2008.
12. Jassies-van der Lee, Rutten V.P.M.G *et al*: CD4+ and CD8+ skin-associated T lymphocytes in canine atopic dermatitis produce interleukin-13, interleukin-22 and interferon  $\gamma$  and contain a CD25+ FoxP3 subset. Veterinary Dermatology 25: 456-463, 2014.
13. Ou LS, Goleva E, Hall C *et al*: T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. Journal of Allergy and Clinical Immunology 113: 756-63, 2004.