



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

**CORRELAZIONE TRA BIOMARCATORI
DELL'OSSIDAZIONE PROTEICA E
POPOLAZIONE LEUCOCITARIA NEL LATTE
BOVINO.**

Relatrice:

Dott.ssa Maria Elena Gelain

Correlatori:

Prof. Gianfranco Gabai

Dott. Federico Bonsembiante

Laureando:

Francesco Lombardo

Matricola n.1044868

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

INDICE

RIASSUNTO	1
SUMMARY	2
1. INTRODUZIONE	3
1.1 CONDIZIONI FISIOPATOLOGICHE DELLA MAMMELLA	3
1.1.1 Cenni di anatomia	3
1.1.2 Cenni di fisiologia	4
1.1.3 Immunologia della mammella.....	5
1.1.4 Mastiti e loro classificazioni	13
1.2 METODICHE CLASSICHE PER IL RILEVAMENTO DELLE MASTITI	15
1.2.1 <i>California mastitis test</i> e batteriologico	15
1.2.2 Rilevazione della conducibilità del latte	16
1.2.3 Conta cellule somatiche	16
1.2.4 Esame citologico	17
1.3 CITOFUORIMETRIA	19
1.4 STRESS OSSIDATIVO E SUOI MARCATORI	24
1.4.1 Infiammazione e stress ossidativo.....	24
1.4.2 <i>Advanced Oxidative Protein Products</i> (AOPP)	26
1.4.3 Carbonili.....	27
1.4.4 Carbonili ed AOPP come marcatori di mastite	27
2. SCOPO DELLA TESI	29
3. MATERIALI E METODI.....	31
3.1.1 Luoghi di prelievo dei campioni	31
3.1.2 Azienda Agricola Marangoni Renato e Vittorio S.s.	31
3.1.3 Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo"	31

3.1.4 Azienda Agricola Arcobaleno di Possamai Flavio e Maurizio	32
3.2 RACCOLTA CAMPIONI.....	33
3.2.1 Identificazione e selezione degli animali	33
3.2.2 Prelievo campioni.....	34
3.3 ESAMI DI LABORATORIO.....	35
3.3.1 Citofluorimetria.....	35
3.3.2 Preparazione campioni per analisi di proteine totali, AOPP e carbonili	39
3.3.3 Dosaggio delle proteine totali	40
3.3.4 Determinazione delle AOPP	41
3.3.5 Determinazione dei carbonili totali.....	42
3.4 ELABORAZIONE DATI ED ANALISI STATISTICA	45
3.4.1 Elaborazione dei dati citofluorimetrici.....	45
3.4.2 Analisi statistica	50
4. RISULTATI	52
4.1 Studio DCC/SCC.....	52
4.2 Relazione tra AOPP e SCC	55
4.3 Relazioni tra le sottopopolazioni leucocitarie ed AOPP	56
4.4 Relazioni tra sottopopolazioni leucocitarie	59
5. DISCUSSIONE	65
6. CONCLUSIONI.....	68
7. BIBLIOGRAFIA.....	71
8. RINGRAZIAMENTI	84

RIASSUNTO

Le mastiti bovine rappresentano un problema considerevole in termini di perdite economiche sia per l'allevatore sia per le industrie casearie oltre al fatto che esse costituiscono un rischio per la stessa alimentazione umana (Direttiva Europea 92/46/CEE). Molti sono i metodi diagnostici messi in campo e sperimentati, con più o meno successo, per la rilevazione delle mastiti. Lo stress ossidativo ed i suoi marcatori proteici (AOPP e carbonili) sono stati ampiamente studiati in umana, ma la loro applicazione in ambito veterinario non è ancora largamente diffusa.

Nel presente studio è stata sperimentata l'efficacia diagnostica di AOPP e carbonili quali marcatori dello stress ossidativo generato durante le mastiti. Sono stati presi in considerazione 47 campioni di latte provenienti da bovine di età e periodo di lattazione casuali. I campioni sono stati classificati in base alla cellularità in: campioni a bassa ($SCC \leq 100000$ cc/ml), media (200000 cc/ml $< SCC \leq 400000$ cc/ml) ed alta cellularità ($SCC > 400000$ cc/ml). Sono stati valutati, per ogni campione, la conta differenziale cellulare (DCC) ed i marcatori dell'ossidazione proteica sopracitati.

I valori misurati delle AOPP hanno evidenziato correlazioni significative con le percentuali di granulociti neutrofili ($P < 0,001$), le percentuali di leucociti totali ($P < 0,001$) e la combinazione tra essi ($P < 0,05$), mentre i carbonili non hanno mostrato relazioni statisticamente significative con nessuno dei parametri oggetto di studio. Non è risultata alcuna correlazione tra il numero di cellule somatiche del latte e la concentrazione delle AOPP. Infine, è stata notata una correlazione positiva tra numero di cellule somatiche e la percentuale di granulociti neutrofili ($P < 0,001$).

SUMMARY

Bovine mastitis represents a considerable problem in term of economic losing both for farmer and for transformation industry. Moreover, they represent a risk for human nutrition (European directive 92/46/CEE). Many diagnostic methods have been experimented and used for the mastitis screening, with controversial results. Oxidative stress and his protein's markers (AOPP and carbonyls) are widely studied in human, but their application in veterinary medicine are not widely used.

In this study, we present the results of the diagnostic performance of AOPP and carbonyls as markers of oxidative stress generated during mastitis. Forty-seven milk samples were randomly collected from cows of different age and lactation period. Samples were classified according to cellularity: low ($SCC \leq 100000$ cc/ml), medium (200000 cc/ml $< SCC \leq 400000$ cc/ml) and high cellularity ($SCC > 400000$ cc/ml). Differential cell count (DCC), AOPP and carbonyls were analysed for each sample.

The AOPP values are significantly related to neutrophilic percentages ($P < 0,001$), total leucocytes percentages ($P < 0,001$) and the combination of both ($P < 0,05$). On the contrary, carbonyls did not demonstrate statistically significative relation with no one of the parameters considered in this study. There is no relation between somatic cell number and the concentration of AOPP. Finally, it was noted a positive relation between somatic cell number and the neutrophilic percentage ($P < 0,001$).

1. INTRODUZIONE

1.1 CONDIZIONI FISIOPATOLOGICHE DELLA MAMMELLA

1.1.1 Cenni di anatomia

Il complesso o corpo mammario nella bovina è suddiviso in quattro mammelle o quarti, ciascuna costituita da una ghiandola mammaria. Esso si trova nella parte ventro-caudale dell'addome. Le quattro mammelle sono strutturalmente e funzionalmente separate tra loro. Esternamente un solco intermammario divide il corpo mammario in una metà destra e sinistra. Ogni mammella è dotata di una papilla principale, comunemente nota come capezzolo. L'intero corpo mammario arriva a pesare fino a 50-60 kg bovine da latte (Dyce et al., 2009).

L'apparato di sospensione è costituito da strati fasciali che sostengono e avviluppano il parenchima ghiandolare. Le lamine mediali destra e sinistra, composte prettamente da connettivo elastico, sono separate da una piccola quantità di connettivo lasso, le lamine laterali sono invece formate da connettivo più compatto.

Dalle lamine mediali e laterali si originano lamelle di connettivo, dette setti interlobulari, che s'interpongono obliquamente tra strati successivi di parenchima (Dyce et al., 2009). Ogni ghiandola mammaria è formata da lobi, lobuli e alveoli (acini). Gli alveoli sono formazioni sacciformi, singole o bifide, composte da epitelio bilaminare secernente. Alveoli e piccoli dotti sono avvolti da cellule mioepiteliali dotate di molte digitazioni, grazie alle quali comprimono il parenchima durante l'eiezione del latte.

I lobuli sono costituiti da circa 200 alveoli ciascuno delimitati da tessuto connettivo. L'insieme di più lobuli costituisce un lobo (Sjaastad et al., 2013).

Il latte formatosi negli alveoli viene riversato nei dotti escretori, i quali a loro volta si fonderanno andando a costituire circa una dozzina di dotti galattofori che convergeranno nel seno lattifero localizzato nella parte ventrale di ogni quarto (Dyce et al., 2009). Il seno lattifero è suddiviso in una parte ghiandolare ed una papillare da una piega della mucosa. La parte papillare termina distalmente con il dotto papillare comunicante con l'esterno (Dyce et al., 2009).

La mammella necessita di un elevato apporto sanguigno; ogni litro di latte prodotto richiede l'apporto di 400-500 litri di sangue (Sjaastad et al., 2013).

L'arteria principale che vascolarizza la mammella deriva dalla pudenda esterna (ramo dell'iliaca esterna), essa attraversa il canale inguinale, prendendo poi il nome di arteria mammaria. Minimo è invece l'apporto ematico dato dall'arteria perineale ventrale, limitato alla sola porzione caudale dei quarti posteriori ed ai linfonodi (Dyce et al., 2009).

I plessi venosi si raccolgono alla base della mammella in un anello venoso, da qui il sangue può defluire attraverso la vena pudenda esterna (satellite dell'omonima arteria) oppure attraverso le vene sottocutanee addominali (vene del latte) che emergono all'estremità craniale del complesso mammario. Queste vene si portano cranialmente rimanendo nel sottocute della parete addominale e penetrandola vicino alla cartilagine xifoidea, s'immettono poi nella vena cava craniale.

Il sangue può in alternativa defluire attraverso la vena perineale ventrale, collegata all'anello vascolare attraverso la vena labiale ventrale (sembra che il flusso possa avvenire in entrambe le direzioni) (Dyce et al., 2009).

Il plesso linfatico risulta molto sviluppato e si ritrova sulla parete del capezzolo e nel connettivo attorno al parenchima, esso si dirige dorsocaudalmente verso i linfonodi mammari (inguinali superficiali) posti nella parte caudale della mammella in posizione dorsolaterale. In generale vi sono due linfonodi per lato, uno grande e superficiale, l'altro piccolo e profondo (Dyce et al., 2009). I vasi linfatici si portano cranialmente e dorsalmente, attraversano il canale inguinale e giungono al linfonodo inguinale profondo, da qui la linfa giunge al tronco lombare (Dyce et al., 2009).

L'innervazione è data dal nervo genitofemorale per quanto riguarda il parenchima ghiandolare e le parti profonde del capezzolo. La cute del complesso mammario è invece innervata cranialmente dalle branche del primo e secondo nervo lombare, medialmente da branche del genitofemorale e caudalmente da rami del nervo pudendo (Dyce et al., 2009).

1.1.2 Cenni di fisiologia

Per mammogenesi s'intende lo sviluppo e differenziazione della ghiandola mammaria prima della secrezione di latte. Dalla nascita alla pubertà la ghiandola va incontro ad una crescita isometrica proporzionale con il resto del corpo, tuttavia già prima della pubertà (sotto effetto di estrogeni, progesterone, somatotropina e

glucocorticoidi) lo sviluppo della stessa diventa allometrico, ovvero eccede lo sviluppo corporeo (Hibbit et al., 2004; Sjaastad et al., 2013).

Solo durante la prima gravidanza avviene una marcata ramificazione dei dotti lattiferi e dei lobuli mammari, tale proliferazione avanza fino al parto. Gli ormoni coinvolti sono gli estrogeni e la somatotropina per quanto riguarda i dotti, mentre il progesterone e la prolattina stimolano la proliferazione lobulo-alveolare. Un ruolo addizionale è svolto da glucocorticoidi ed ormoni tiroidei (Hibbit et al.2004).

La lattogenesi (inizio della secrezione di latte) è stimolata da una diminuzione dei livelli di progesterone unitamente ad un aumento dei livelli di prolattina e glucocorticoidi nel sangue (Hibbit et al.2004).

La sintesi dei costituenti del latte avviene attraverso la captazione dei componenti primari dal circolo con sistemi di trasporto specifici. Successivamente le cellule secernenti elaborano tali componenti per formare il latte.

L'eiezione del latte parte da uno stimolo meccanico a livello della mammella che attraverso le vie afferenti giunge all'ipotalamo posteriore. Qui cellule neuroendocrine producono l'ossitocina trasportandola attraverso gli assoni e liberandola in circolo a livello dell'ipofisi posteriore. Tale ormone raggiunge il picco ematico nell'arco di due minuti andando a stimolare la contrazione delle cellule mioepiteliali (Hibbit et al., 2004; Sjaastad et al., 2013).

Nella bovina il mantenimento della produzione lattea è sostenuto dalla somatotropina (prodotta e liberata dall'ipofisi), che a sua volta stimola la produzione di somatomedine (IGFs) nel fegato ed in altri organi (Hibbit et al., 2004).

1.1.3 Immunologia della mammella

L'immunità della mammella è suddivisa in un sistema di difesa aspecifico o innato ed uno specifico. Il primo predomina nella fase iniziale dell'infezione, è sempre presente o viene attivato velocemente in caso di necessità ed è composto da: naturali barriere anatomiche, granulociti neutrofili, macrofagi, linfociti *natural killer* e sostanze solubili. Il sistema specifico o acquisito, differentemente da quello innato, riconosce specifici patogeni permettendone l'eliminazione selettiva, esso è coadiuvato nella sua funzione da macrofagi ed altre cellule presentanti l'antigene. Una funzione molto importante svolta dall'immunità acquisita è la "memoria",

ovvero l'aumentare della risposta ad un determinato patogeno in seguito al ripetersi delle esposizioni ad esso (Sordillo & Derosa, 1997).

La prima linea di difesa contro gli agenti patogeni è rappresentato dal dotto papillare (canale del capezzolo), il quale agisce sia come barriera fisica che come fonte di sostanze antimicrobiche. La barriera fisica è costituita dallo sfintere del dotto papillare che agisce sia evitando la fuoriuscita di latte che la risalita dei batteri (Zecconi et al., 2000).

Il dotto papillare è inoltre occluso da una sostanza cerosa bianca composta da cheratina derivata dall'esfoliazione delle cellule epiteliali squamose, questa matrice oltre a separare il latte dall'ambiente esterno intrappola i batteri che risalgono il dotto. Un altro fattore che previene l'instaurarsi d'infezioni è la costante mungitura (*the solution to pollution is dilution*), la quale esercita un'azione dilavante nei confronti dei batteri non adesi alle pareti del dotto (Hibbit et al., 2004).

Tra le sostanze antimicrobiche prodotte all'interno del dotto papillare ritroviamo l'acido miristico, palmitoleico e linoleico. Sono inoltre state isolate alcune proteine, la cui peculiarità è di presentarsi come cationi al pH fisiologico, legando così i patogeni che allo stesso pH si presentano come anioni (Hibbit et al., 2004).

La lattoferrina è una proteina chelante il ferro che, in presenza di bicarbonato, inibisce la crescita ai microrganismi con un alto fabbisogno di ferro (Hibbit et al., 2004), è inoltre in grado di provocare un danno diretto alle membrane di una vasta gamma di batteri Gram+ (Erdei et al., 1994) oltre a svolgere un ruolo immunomodulatore nei confronti del sistema innato e acquisito (Ezzat Alnakip et al., 2014). All'interno della mammella la lattoferrina viene prodotta primariamente dall'epitelio secernente e secondariamente dai polimorfonucleati (PMN) (Ezzat Alnakip et al., 2014; Persson et al., 1992). L'espressione di tale enzima in condizioni fisiologiche è inversamente proporzionale allo sviluppo alveolare della ghiandola e quindi alla produzione di latte, sicché si ritrova in maggiori concentrazioni nel colostro ed in fase di asciutta, mentre è scarso durante la lattazione (Cheng et al., 2008; Hagiwara et al., 2003; Molenaar et al., 1996). In caso di mastite la lattoferrina può invece aumentare di 30 volte nel latte (Hagiwara et al., 2003).

Altro enzima presente è la lattoperossidasi che, in presenza di tiocianato e perossido d'idrogeno, produce un sistema ossidativo potente (ipotiocianato), ma limitato nel tempo. L'ipotiocianato ha azione battericida nei confronti dei batteri Gram-negativi, mentre è batteriostatico per i Gram-positivi (Hibbit et al., 2004). La

xantina ossidasi è un enzima che coadiuva la funzione della lattoperossidasi attraverso la formazione di H_2O_2 che viene poi utilizzata per sintetizzare l'ipotiocianato (Hibbit ed al., 2004). Enzima simile alla lattoperossidasi è la mieloperossidasi, presente primariamente nei granuli dei granulociti neutrofili, svolge un ruolo microbicide importante catalizzando la stessa reazione della lattoperossidasi e producendo inoltre l'acido ipocloroso (Sordillo & Derosa, 1997).

Il lisozima (N-acetilmuramico idrolasi) ha una funzione antibatterica soprattutto contro i batteri Gram+; come risulta chiaro dal nome, svolge il suo compito lisando la matrice di peptidoglicani di cui è composta la parete batterica (Ezzat Alnakip et al., 2014; Priyadarshini & Kansal, 1980). Generalmente il lisozima viene prodotto in situ oppure viene captato dalla mammella dal sangue, mentre durante le mastiti sembra che le fonti siano i leucociti presenti nell'organo (Nickerson, 1985; Persson et al., 1992). La concentrazione di tale enzima non rimane costante nel tempo, ma varia a seconda dello stato patologico, dell'età, del numero di parti e del periodo della lattazione (Ezzat Alnakip et al., 2014; Priyadarshini & Kansal, 1980). La quantità di lisozima presente nel latte bovino risulta scarsa se paragonata a quella dell'uomo; risulta quindi poco rilevante l'attività difensiva svolta da questo enzima (Sordillo & Derosa, 1997). La transferrina è un'altra proteina chelante il ferro presente a basse concentrazioni nel latte dei ruminanti (Ainard & Iollet, 2006). Tale proteina non viene sintetizzata dalla mammella, bensì viene fisiologicamente captata per transitosi dal plasma, mentre giunge nella mammella mastitica tramite essudazione del siero (Ainard & Iollet, 2006; Olliver-Bousquet, 1998).

Qualora i patogeni riuscissero a superare le prime barriere chimico-fisiche del capezzolo e della mammella, entrerebbero a contatto con granulociti neutrofili, macrofagi e i linfociti, cellule rispettivamente deputate alla risposta immunitaria innata e acquisita (Sordillo, 2005). I granulociti neutrofili, leucociti polimorfonucleati, insieme ai macrofagi rappresentano l'immunità cellulare aspecifica, essi vengono richiamati celermente nel sito d'infezione e sono il tipo cellulare maggiormente presente sia nel tessuto mammario che nel latte durante l'infiammazione acuta causata da batteri (Paape et al., 2003). La presenza dei neutrofili è scarsa nella ghiandola mammaria priva di patologie ($<10^5$ cellule/ml), mentre durante le mastiti possono rappresentare il 90% dei leucociti ($>10^6$ cellule/ml), essi passano attraverso la marginalizzazione e la diapedesi dal circolo sanguigno alla ghiandola mammaria guidati dai comuni mediatori dell'infiammazione (Persson et al.,

1993). Le sostanze chemiotattiche che guidano i PMN sono in genere liberate da macrofagi e dalle cellule epiteliali della mammella. I granulociti neutrofili per riconoscere e legare i batteri necessitano dell'aiuto di componenti del complemento ed immunoglobuline (Ig). Le Ig preposte a tale compito sono le IgG₂ e le IgM, le quali, dopo aver riconosciuto regioni specifiche del batterio, legano i recettori Fc dei PMN (Worku et al., 1994). Le frazioni del complemento C3b e C3bi formatesi dopo il legame anticorpale con il patogeno vengono riconosciute dai recettori neutrofilici CR1 (CD35) e CR3 (Paape et al., 2002). Una volta che i batteri aderiscono alla membrana plasmatica dei neutrofili si attiva il *burst* ossidativo, una breve e intensa attivazione del metabolismo respiratorio, che dà vita a potenti ossidanti (*reactive oxygen species*, ROS) quali il perossido d'idrogeno, il superossido ed i radicali idrossili. I ROS oltre a digerire i batteri creano anche danno ai tessuti circostanti. I macrofagi, per ridurre il danno provocato dai ROS prodotti dai granulociti neutrofili, fagocitano i PMN apoptotici (Paape et al., 2003; Paape et al., 2002).

I macrofagi della mammella derivano da un processo di differenziazione dei monociti circolanti, essi rappresentano la popolazione leucocitaria predominante presente nel latte e nel tessuto mammario sano sia in lattazione che in asciutta (Napel et al., 2009). Anche i macrofagi, come i neutrofili, svolgono un'attività fagocitaria nei confronti di batteri e corpi estranei disgregandoli attraverso ROS e proteasi (Denis et al., 2006). Tali cellule hanno inoltre la capacità di processare e presentare gli antigeni ottenuti dalla lisi batterica ai linfociti attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (Major Histocompatibility Complex, MHC II) (Craven, 1983; Fitzpatrick et al., 1992). I macrofagi posseggono i recettori per le IgG₁ e IgG₂ (Rossi & Kiesel, 1977), ma, differentemente dai neutrofili, posseggono meno recettori per la porzione Fc degli anticorpi, indi per cui svolgono una minore attività fagocitaria anticorpo-mediata (Sordillo, 2005).

I linfociti possono essere considerati gli elementi cardine della risposta immunitaria acquisita, essi sono in grado di riconoscere elementi cellulari appartenenti all'ospite da quelli estranei, permettendo al sistema immunitario di reagire nei confronti di questi ultimi pur rimanendo areattivo nei confronti dei primi (Poli et al., 2011). Al loro interno i linfociti si possono dividere in due gruppi a seconda dei recettori di superficie espressi: linfociti B e linfociti T. Quest'ultimi, deputati all'immunità cellulo-mediata, possono essere classificati in base al recettore per l'antigene (*T cell receptor*, Tcr) in $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, oppure attraverso le proteine di

superficie (antigeni) in CD4+ (*T helper*) e CD8+ (T citotossici o soppressori). Nella ghiandola mammaria prevalgono i linfociti T $\alpha\beta$ con espressione predominante del fenotipo CD8+ differentemente da quanto accade nel circolo periferico dove è prevalentemente espresso il fenotipo CD4+ (Shafer-Weaver & Sordillo, 1996; Sordillo & Derosa, 1997; Sordillo, 2005). Secondo altre fonti il rapporto tra linfociti CD8+ e CD4+ nel sangue sarebbe di 1,5, mentre nel latte arriverebbe solamente a 0,85 (Kenny et al., 2004). Il rapporto tra queste sottopopolazioni può variare a seconda delle condizioni fisiopatologiche della mammella. Studi in questo senso sono stati eseguiti attraverso infezioni sperimentali, rilevando che se in un primo momento (24 ore) il rapporto CD4+/CD8+ diminuisce per l'aumento dei linfociti T CD8+, in un secondo momento (72 ore) il rapporto aumenta di due volte a causa del reclutamento dei linfociti T CD4+ (Mehrzhad et al., 2008). Durante la lattazione predominano i linfociti T CD8+ con un aumento dei linfociti $\gamma\delta$, mentre in asciutta sono i linfociti CD4+ i predominanti (Asai et al., 2000). Va specificato che i linfociti T $\gamma\delta$ si ritrovano in quantità maggiore nel latte rispetto al sangue, tuttavia il fenotipo predominante risulta sempre l' $\alpha\beta$ (Machugh et al., 1997; Shafer-Weaver & Sordillo, 1996). Altri studi hanno rivelato che i linfociti CD8+ presenti nel postpartum sono del tipo *suppressor* mentre quelli presenti da metà a fine lattazione sono del tipo citotossico, questo sembra portare ad una risposta immunitaria meno efficace durante l'inizio lattazione (Sordillo & Derosa, 1997).

I linfociti B sono responsabili della produzione e liberazione delle Ig (risposta immunitaria umorale), ruolo che svolgono dopo la differenziazione in plasmacellule. A seconda dello stadio maturativo le Ig si possono incontrare nel citoplasma (cellule immature), sulla membrana citoplasmatica (cellule mature) o possono essere liberate dalle plasmacellule nei liquidi organici. Le cellule mature sono caratterizzate dal fatto di veicolare sulla loro superficie l'isotipo di Ig che produrranno a seguito dell'incontro con l'antigene specifico, mentre le IgM e IgD sono presenti su tutti i linfociti B. Altra importante funzione dei linfociti B è quella di cellule della "memoria" immunitaria (Poli et al., 2011). Oltre alle funzioni precedentemente citate il linfocita B ha la caratteristica di riconoscere specifici patogeni attraverso le loro strutture di superficie, inglobarli, processarli per poi presentare l'antigene (Ag) ai linfociti *T helper* attraverso l'MHC II (Ezzat Alnakip et al., 2014; Sordillo & Streicher, 2002). Differentemente per quanto accade nei linfociti T, i linfociti B rimangono relativamente costanti in numero durante i vari periodi della lattazione (Paape et al.,

2000), mentre sembrano aumentare durante le mastiti (Riollet et al., 2001). Per quanto riguarda le Ig più comunemente prodotte e rinvenute nel latte si è riscontrato che, una volta infusi Ag direttamente nella mammella, gli anticorpi più comunemente presenti sono le IgA e IgG₁, prodotte localmente nello stroma o nei linfonodi sopramammari. Inoltre, nella regione terminale del capezzolo l'88% di plasmacellule sintetizza IgG₁, il 10% IgM, mentre vengono poco espresse le IgA (Hibbit et al., 2004).

I natural killer (NK) sono cellule che non veicolano sulla loro superficie marcatori che le possano classificare all'interno della popolazione di linfociti B e T, vengono perciò chiamate "nulle". Tali cellule sono in grado di esplicare azione citotossica diretta senza che ci sia stata una stimolazione antigenica pregressa (Poli et al., 2011). E' stato infatti dimostrato, almeno nel topo, che tali cellule sono dotate del *toll-like receptor* (TLR) di tipo 2 e 5 che gli permettono di riconoscere direttamente i patogeni (Chalifour et al., 2004). Inoltre le cellule NK attivate sono grandi produttrici d'interferone- γ (INF- γ), coadiuvando perciò l'azione dei linfociti T helper e ponendosi a cavallo tra l'immunità innata ed acquisita (Boysen et al., 2008; Vankayalapati et al., 2003). Nella Tabella 1.1 vengono riassunte le popolazioni leucocitarie, la loro prevalenza e quantità nella ghiandola mammaria sana e mastitica.

Popolazione	Latte sano	Latte mastitico
SCC	Normalmente inferiori a $1 \cdot 10^5$ cellule/ml nel latte.	Viene considerato come indice d'infiammazione se l'SCC superiori a $2 \cdot 10^5$ cellule/ml. In caso di severa infiammazione l'SCC può superare $1 \cdot 10^6$ cellule/ml in poche ore.
Leucociti	Rappresentano il 75% delle cellule somatiche.	Incremento notevole del loro numero durante l'infiammazione in relazione alla sua gravità.
Macrofagi	Costituiscono il 35%-79% dei leucociti nel latte sano.	Vanno dal 9% al 32% dei leucociti.
Linfociti	Dal 10% al 28% dei leucociti totali. Con i linfociti T al 40-50% dei leucociti ed i B al 20-25%. Prevalgono le cellule T $\alpha\beta$ CD8+ che raggiungono circa il 50-60% della popolazione di linfociti T.	Rappresentano il 14-24% dei leucociti totali. I CD4+ diventano il fenotipo attivato preponderante a seguito del riconoscimento di MHC II. In taluni casi d'infiammazione cronica i CD8+ predominano sui CD4+.
Polimorfonucleati	Dal 3% al 26%	Costituiscono il 90% e oltre della popolazione leucocitaria anche nel caso d'infiammazione cronica batterica rimangono predominanti.

Tabella 1.1. Prevalenze delle sottopopolazioni leucocitarie nella mammella (Ezzat Alnakip et al., 2014).

Oltre alle popolazioni leucocitarie ed agli anticorpi fanno parte del sistema immunitario una famiglia di sostanze chiamate citochine suddivise al loro interno in: interleuchine (IL), interferoni (INF), *Tumor Necrosis Factor (TNF)* e *Transforming Growth Factor (TGF)*. Le citochine sono proteine solubili prodotte durante il processo infiammatorio, la gran parte di esse è dotata di diverse funzioni che spesso s'intersecano con quelle di altre citochine (Taniguchi, 1995). Le principali citochine

presenti nella mammella, oltre alla loro provenienza e funzione, sono riassunte nella tabella (Tabella 1.2).

Citochina	Provenienza	Funzione
IL-1	Macrofagi Linfociti Monociti Cellule endoteliali Fibroblasti	Citochina proinfiammatoria, favorisce il richiamo di neutrofili nella ghiandola mammaria ed aumenta la loro attività fagocitaria e battericida. Inoltre, stimola la secrezione di IL-1, 6, 8, 12 e del TNF- α .
IL-2	CD4+ (Th1)	Stimola la proliferazione di linfociti B e plasmacellule, attiva le NK ed intensifica l'attività citotossica dei T.
IL-4	CD4+(Th2) CD8+ suppressor Linfociti B	Regola la differenziazione dei linfociti T e svolge un'azione inibitoria contro INF- γ .
IL-6	Macrofagi Linfociti Monociti Neutrofili Endotelio Epitelio mammario	Proprietà sia antinfiammatorie che proinfiammatorie, attira i macrofagi nella ghiandola mammaria, induce l'attivazione dei linfociti B e dei neutrofili da parte dei linfociti T.
IL-8	Monociti Linfociti T Macrofagi Polimorfonucleati Epitelio mammario	Efficiente chemochina soprattutto per i neutrofili, stimola la fagocitosi e l'attività microbica dei neutrofili.
IL-10	Th2 Linfociti B Monociti Eosinofili Mastociti	Rappresenta la maggiore citochina antinfiammatoria: previene la produzione di citochine, chemochine ed eicosanoidi, inibisce la produzione di T helper e riduce l'espressione MHC II sui macrofagi e quindi la presentazione dell'antigene.
IL-12	Macrofagi Linfociti B Monociti Neutrofili	Regola la differenziazione dei linfociti T, accresce la capacità citotossica NK, stimola la produzione di INF- γ , favorisce la produzione di TNF- α , IL-6, IL-8, IL10 e Ig opsonizzanti.
IL-17	Linfociti T della memoria attivati	Citochina proinfiammatoria che stimola l'espressione di una vasta gamma di altre citochine e chemochine da parte di più popolazioni leucocitarie.
INF- γ	Linfociti T (Th1 e citotossici) NK Monociti	Funzioni simili ad IL-2, inoltre stimola l'espressione delle MHC I e II.
TNF- α	Macrofagi Neutrofili Epitelio mammario	Principale citochina prodotta la fase acuta dell'infezione. Stimola la risposta infiammatoria, la fagocitosi e la secrezione di IL-8

TGF α TGF β	Epitelio mammario Fibroblasti Neutrofili Macrofagi Eosinofili	Stimola la riparazione dei tessuti danneggiati dall'infiammazione, ha funzione sia pro che antinfiammatoria ed induce la fibrosi.
-----------------------------	---	---

Tabella 1.2. Provenienze e ruolo delle principali citochine a livello mammario. Presa da (Ezzat Alnakip et al., 2014).

1.1.4 Mastiti e loro classificazioni

Per "mastite" s'intende un'infiammazione della ghiandola mammaria; tale termine deriva dal greco *mastos* (mammella) a cui si appone il suffisso tipico di ogni infiammazione (*ite*) (Schalm et al., 1975). Le mastiti possono essere classificate in termini clinici, epidemiologici ed eziologici. Dal punto di vista clinico le mastiti vengono suddivise in:

- mastite sub-clinica- caratterizzata dalla presenza di microrganismi patogeni nel latte con un aumento delle cellule somatiche e variazione delle caratteristiche chimiche, senza tuttavia la rilevazione di segni clinici;

- mastite clinica- caratterizzata dalla possibilità d'isolamento di agenti patogeni, alterazioni a carico della mammella e della secrezione latte.

La mastite clinica si suddivide a sua volta in mastite acuta, sub-acuta e cronica:

- mastite acuta- caratterizzata da un notevole e celere aumento di volume della mammella che può apparire arrossata, calda e dolente, modificazioni macroscopiche della secrezione latte (aspetto sieroso, con coaguli o ematico) e ridotta secrezione fino all'agalassia; talvolta possono comparire sintomi sistemici (febbre, atonia ruminale ecc.)

- mastite sub-acuta- caratterizzata da modificazioni apprezzabili a carico della mammella alla palpazione, secrezione latte con profonda modificazione dei parametri chimici, costante presenza di frustoli di fibrina o coaguli nei primi getti e più o meno ridotta secrezione latte;

- mastite cronica- caratterizzata dalla presenza di patogeni, conta cellulare oltre la norma, presenza di fibrosi all'interno del tessuto mammario, ridotta ed alterata produzione di latte (Riboldi, 1993).

Dal punto di vista epidemiologico le mastiti possono essere suddivise in contagiose ed ambientali. Le mastiti contagiose sono dovute a patogeni il cui

serbatoio sono i capezzoli o la mammella (*Staphylococcus aureus*, stafilococchi coagulasi negativi, *Streptococcus agalactiae* e *dysgalactiae*), la loro principale via di trasmissione è costituita dalle mani del mungitore e dagli oggetti utilizzati per la pulizia del capezzolo. Una volta che i patogeni si sono instaurati sulla cute del capezzolo o nel dotto papillare l'infezione passa per via ascendente alla ghiandola mammaria e spesso rimane presente come forma sub-clinica. La conta delle cellule somatiche (*somatic cell count*, SCC) al di sopra delle $2 \cdot 10^5$ cellule /ml nel latte di massa è abbastanza indicativo di mastiti contagiose. Le mastiti ambientali hanno come serbatoio dei patogeni l'ambiente (*Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Klebsiella* e *Bacillus* spp.), la contaminazione della cute della mammella e del capezzolo, diversamente dalle contagiose, avviene durante il tempo che intercorre tra le mungiture. La gran parte delle mastiti ambientali sono cliniche (Edmondson & Bramley, 2004). La classificazione eziologica delle mastiti è basata semplicemente sul patogeno responsabile dell'infezione.

1.2 METODICHE CLASSICHE PER IL RILEVAMENTO DELLE MASTITI

1.2.1 *California mastitis test* e batteriologico

Il *California mastitis test* (CMT) è il più famoso metodo diagnostico per mastiti, basato su una misurazione indiretta del numero di cellule somatiche presenti nel latte; usa un detergente contenente bromocresolo per lisare le membrane cellulari, gli acidi nucleici vengono quindi liberati ed aggregandosi vanno a formare una matrice gelatinosa con una viscosità direttamente proporzionale al numero di cellule contenuto. Le caratteristiche che hanno garantito il successo di questo vecchio test sono l'economicità e la facilità di esecuzione anche in campo, nonostante sia poco sensibile (Viguier et al., 2009).

L'esame batteriologico risulta essere il miglior metodo per quanto riguarda l'identificazione dell'agente eziologico causante la mastite (Koskinen et al., 2010), ciò nonostante risulta essere un test non privo di difetti, primo tra tutti la lentezza dei risultati; le colture convenzionali impiegano infatti dalle 24 alle 48 ore per dare un risultato (Koskinen et al., 2010). In aggiunta può avvenire una non corretta identificazione del patogeno (dal 9 al 37 % dei casi) (Pitkälä et al., 2005), mentre nel 25-45% delle colture non vi è nemmeno una crescita batterica oltre le 48 ore (Bradley et al., 2007; Makovec & Ruegg, 2003). Possibili cause della negatività dell'esame batteriologico sono il congelamento del campione, l'aumento dell'intervallo di tempo intercorrente tra il campionamento e l'analisi, le condizioni ottimali di crescita del batterio oltre alla sua eventuale escrezione intermittente (Edmonson et al., 2004).

1.2.2 Rilevazione della conducibilità del latte

Questo test si fonda sulla misurazione dell'aumento di conduttanza del latte derivante dall'innalzamento delle concentrazioni di ioni quali sodio, calcio, cloro e magnesio durante l'infiammazione; infatti la modificazione della permeabilità dei vasi e dell'epitelio mammario provoca l'innalzamento della concentrazione di questi ioni (Viguiet et al., 2009). L'unico ione che invece sembra diminuire è il potassio (Edmonson et al., 2004). Tale sistema ha un grande utilizzo di campo nei robot di mungitura, rappresentando un sistema rapido di diagnostica quotidiana. La velocità di *screening* va a scapito della specificità poiché sono molti i fattori che possono portare ad un aumento della conduttanza del latte (Edmonson et al., 2004).

1.2.3 Conta delle cellule somatiche

I leucociti sono la popolazione cellulare che costituisce maggiormente le cellule somatiche presenti nel latte, in secondo piano vi sono le cellule epiteliali esfoliate dal tessuto secernente. La misurazione della concentrazione cellulare del latte è comunemente nota come SCC abbreviativo di *somatic cells count* (O'Rourke & Blowey, 2004). Come normalmente accade in qualsiasi tessuto, la risposta infiammatoria ed i suoi fattori attirano i leucociti dal sangue alla mammella, aumentando di conseguenza il numero di cellule che si vengono a trovare nel latte. Purtroppo, le fluttuazioni di questo parametro sono dovute a molti altri fattori oltre all'infiammazione; primo tra tutti lo stadio di lattazione, che porta ad avere l'SCC elevato ad inizio lattazione con un calo progressivo nei mesi successivi ed un nuovo aumento a prima dell'asciutta (O'Rourke & Blowey, 2004). Altri fattori possono essere l'età della vacca (SCC aumenta con l'età) (Blackburn, 1966), lo stress, la stagione, l'estro ed il numero di mungiture (Schalm et al., 1971).

Vari metodi in parte efficaci sono stati nel tempo sperimentati per determinare la concentrazione delle cellule somatiche del latte, in seguito verranno brevemente descritti i più efficaci.

La conta al microscopio delle cellule somatiche, detta DMSCC dall'inglese "*Direct milk somatic cells count*", viene eseguita attraverso la colorazione a secco di una quantità nota di latte, il tipo di coloranti dipendono dalle metodiche utilizzate. In seguito, le cellule evidenziate alla colorazione vengono contate da un laboratorista.

La DMSCC, oltre che tediosa per chi la esegue, risulta soggettiva e non priva di errori legati alla disomogeneità della distribuzione cellulare; perciò viene in genere utilizzata come metodica di raffronto con altre tecniche sperimentali e non (Heeschen, 1975).

Gli altri due metodi più famosi prevedono la conta elettronica delle cellule somatiche. Il primo è il Coulter Counter (International Dairy Federation, 1981) e si basa sull'impedenzometria; il campione passa attraverso un'apertura di 100 µm tra due elettrodi che registrano il passaggio di una cellula a bassa conducibilità in mezzo ad un liquido ad alta conducibilità, il numero d'interruzioni indica il numero di cellule presenti. Il campione richiede un trattamento preventivo del latte atto a stabilizzare le cellule, diluire il latte con un fluido elettrolitico e disperdere le particelle di grasso (O'Rourke & Blowey, 2004). Il secondo, il Fossomatic (FSCC) (IDF, 1981), è un microscopio automatico per la conta cellulare all'interno di campioni liquidi; le cellule sono colorate con l'etidio bromuro, fluoroforo capace di penetrare la cellula ed intercalarsi al DNA, ed esposte ad una lampada ad alta energia che le permette di emettere luce ad una determinata lunghezza d'onda captata dallo strumento. Tale strumento sebbene sia dispendioso è vantaggioso per rapidità ed automatismo. Una tecnica simile è rappresentata dal DeLaval *cell counter*, il quale differisce dal FSCC per l'utilizzo del propidio ioduro come fluoroforo (O'Rourke & Blowey, 2004; Viguier et al., 2009).

1.2.4 Esame citologico

L'esame citologico del latte o conta differenziale cellulare (*differential cell count*, DCC) è un metodo molto semplice, anche se superato, per indagare le varie sottopopolazioni leucocitarie presenti nel latte. La metodica messa a punto da Dulin et al. (1982) richiede che il latte sia diluito in proporzione 2/5 con PBS-EDTA (0,5% di EDTA) e poi centrifugato. In seguito, il pellet di cellule precipitato va risospeso con PBS-EDTA e ricentrifugato per poi essere disteso sul vetrino, asciugato e colorato con la colorazione May-Grünwald-Giemsa. Una volta ottenuto il vetrino vanno contate dalle 100 a 200 cellule e ripartite nelle varie sottopopolazioni (linfociti, macrofagi, granulociti polimorfonucleati), tenendo conto che le cellule epiteliali sono indistinguibili dai macrofagi (Pilla et al., 2012). Va comunque detto che tale metodica

nonostante possa sembrare arcaica, possiede la stessa sensibilità della citofluorimetria nell'identificazione delle mastiti (Rivas, 2001).

1.3 CITOFLUORIMETRIA

La citofluorimetria o citometria a flusso (CF) è una tecnica per la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un veicolo fluido. In questo caso il nostro interesse sarà incentrato nella citofluorimetria ad immunofluorescenza, la quale, utilizzando particolari anticorpi monoclonali, è in grado di differenziare i sottotipi leucocitari presenti nel campione. Nei citometri a flusso il campione contenente la sospensione cellulare viene ridotto ad una sottile colonna di fluido in cui le cellule sono disposte in monostrato durante l'attraversamento di un fascio di luce focalizzata. La finalità è di misurare più parametri cellulari contemporaneamente ed in seguito analizzarli con l'utilizzo di software dedicati (Valtriani & Hurle, 1997).

Nel suo insieme il citofluorimetro è composto da quattro elementi: il sistema fluidico, il sistema di sorgenti luminose, il sistema ottico ed il computer.

- Il sistema fluidico - Il fluido viene trasportato dal sistema di dispensazione del campione alla camera di flusso attraverso un piccolo ago cavo. Grazie ad un sistema pneumatico il fluido viene spinto attraverso il fascio luminoso alla velocità impostata dall'operatore. Risulta fondamentale per il sistema che le cellule passino il fascio luminoso allineate e non affiancate. Il fluido, una volta passato nel circuito, confluisce in un contenitore apposito esterno al citofluorimetro.
- Sorgenti luminose - I citometri a raggio laser utilizzano prevalentemente una fonte luminosa a ioni Argon di potenza variabile e con una lunghezza d'onda di 488 nm (blu). Per emettere ad altre lunghezze d'onda sono necessari differenti tipi di laser quali: Krypton, Elio-Cadmio, Elio-Neon e CO₂ (Steinkamp, 1984). Altre fonti di luce possono essere costituite da lampade ad incandescenza allo Xenon e a Mercurio le quali, oltre al fatto che risultano meno costose, non richiedono un sistema di raffreddamento e sono più facili da utilizzare, emettono uno spettro più ampio (200-600 nm e 600-1200 nm) (Steinkamp, 1984). Oggigiorno, in veterinaria, sono utilizzati soprattutto macchinari che contengono fino a tre fonti di luce differenti per ampliare la gamma di λ in cui emettere ed i fluorofori da eccitare.
- Il sistema ottico - E' costituito da lenti, specchi, filtri ottici e fotomoltiplicatori (Wilkerson, 2012). Una volta che la cellula viene

colpita dal fascio luminoso (ad incidenza perpendicolare rispetto al flusso del liquido) devia il fascio di luce e svela le sue caratteristiche morfologiche attraverso la rifrazione, riflessione (*side scatter*) e diffrazione (*forward scatter*). La luce che viene diffratta (i.e. la luce dispersa frontalmente entro piccoli angoli o *forward scatter*, FSC) è raccolta da un sensore chiamato fotodiodo, dando informazioni sulla dimensione cellulare (Valtriani & Hurle, 1997), come una sorta di "ombra cinese". La radiazione luminosa che invece passa attraverso il campione senza essere deviata dalla cellula viene schermata da una barretta di oscuramento posta dietro il punto d'incontro tra fascio di luce e campione (Valtriani & Hurle, 1997). La luce che viene invece riflessa o rifratta dalla cellula in una direzione di 90 gradi (*side scatter*, SCC) viene raccolta da un altro sensore, essa permette di ottenere informazioni sulla complessità della cellula, quindi sulla lobularità del nucleo e granularità del citoplasma (Wilkerson, 2012). Combinando questi due tipi di segnale si ottiene un diagramma (detto "citogramma" o "*dot plot*") in cui le popolazioni cellulari sono differenziabili in base alla loro dimensione e complessità. Ulteriori informazioni che riguardano invece l'espressione di molecole antigeniche sulla membrana, nel citoplasma o sul nucleo possono essere ottenute legando direttamente alla cellula ligandi fluorescenti oppure anticorpi monoclonali (mAb) coniugati con fluorofori (Valtriani & Hurle, 1997). Suddetti fluorofori sono dotati di diverse lunghezze d'onda d'assorbimento ed emissione, le quali vengono convogliate attraverso un sistema di lenti ai fotomoltiplicatori (PTM) dedicati al rilevamento delle specifiche lunghezze d'onda o fluorescenze (FL₁, FL₂, FL₃, FL₅) (Steinkamp, 1984).

- Il sistema di analisi (*computer*) - Gli impulsi derivanti dai fotomoltiplicatori vengono trasformati in segnali digitali, fruibili per il computer, da un convertitore analogico-digitale. Il computer può dare luogo a varie rappresentazioni dei dati; il più semplice è l'istogramma con in ascissa riportata la scala della grandezza misurata, mentre in ordinata si trova il numero di cellule, più immediata invece la rappresentazione "dot-plot" in cui ogni singolo punto rappresenta un evento contato. Attraverso il programma di analisi si può applicare anche il "gate" ovvero

isolare all'interno della popolazione cellulare studiata un sottoinsieme di cellule, in base a determinati parametri, per poi studiarne altre caratteristiche altrimenti schermate dalle restanti sottopopolazioni (Valtriani & Hurle, 1997). Altra caratteristica del software è la "compensazione"; va detto, infatti, che ad un dato PTM possa giungere una lunghezza d'onda non voluta a causa dell'ampio spettro d'emissione del fluoroforo o delle caratteristiche di filtri e lenti (Kalina et al., 2012; Valtriani & Hurle, 1997). Per quanto riguarda i fluorofori, essi non hanno lunghezze d'onda puntiformi, bensì degli intervalli d'emissione e d'assorbimento che vanno a sconfinare l'uno nell'altro (Kalina et al., 2012). Capiterà, ad esempio, che cellule a cui si sono legati Ab coniugati con FITC e PE (due fluorofori) possano essere lette come emettitrici di luce sia dal PTM per FL₁ sia dal PTM per FL₂, in questo caso la procedura di "compensazione" esclude tali cellule dalla conta differenziale. Per meglio comprendere poniamo di avere due popolazioni cellulari A e B a cui si sono legati rispettivamente i fluorofori X e Y, questi purtroppo hanno spettri di lunghezza d'onda d'emissione simili, perciò alcune cellule A e B vengono "interpretate" come appartenenti sia alla popolazione A che alla popolazione B, in virtù del fatto che i loro fluorofori vengono "confusi" dai canali di lettura (Figura 1.1).

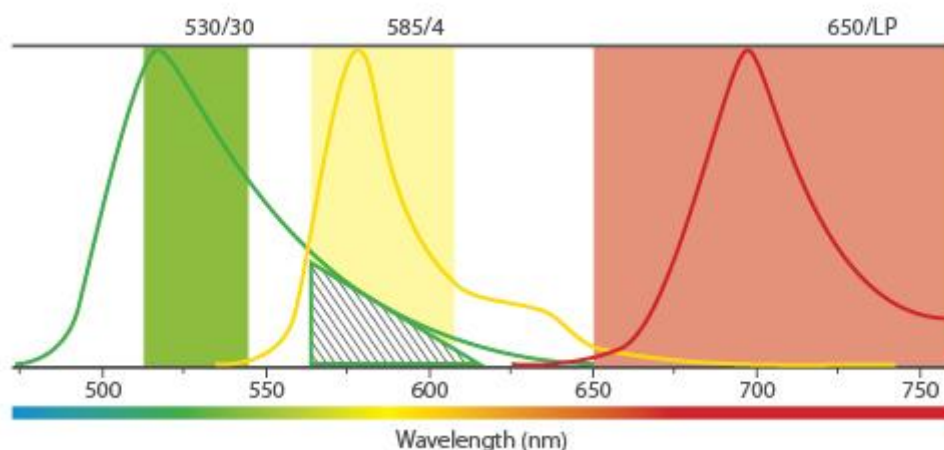


Figura 1.1 Esempio di sovrapposizioni spettrali tra FITC (curva verde) e PE (curva gialla), la fluorescenza causata dal FITC deve essere sottratta tramite compensazione dal canale del PE (Affymetrix eBioscience, 2017.)

Lo sviluppo della CF prende il via sulla fine degli anni sessanta (Valtriani & Hurle, 1997), tuttavia il suo utilizzo per la conta differenziale delle cellule somatiche

nel latte vaccino è entrato in auge solo sul finire degli anni '80 (Redelman et al., 1988), da allora si sono svolti molti studi riguardanti le percentuali di sottopopolazioni leucocitarie presenti nel latte bovino. Gli studi sono stati portati avanti spesso con l'ausilio di anticorpi marcati con fluorofori sia sintetici sia d'origine naturale: fluoresceina isocianato (FITC), ficoeritrina (PE) e alloficocianina (APC). Tutte queste ricerche hanno fatto luce sulle percentuali delle varie famiglie leucocitarie presenti nella mammella in condizioni patologiche e non (Pilla et al., 2013; Leitner et al., 2000; Leitner et al., 2003; Koess & Hamann, 2008). Le molecole che sono riconosciute da un gruppo specifico di mAb vengono classificate attraverso la scritta "CD" (cluster of differentiation) seguita da un numero. A titolo riassuntivo proponiamo la tabella (Wilkerson, 2012; Wilkerson & Mastrorilli, 2010) (Tabella 1.3).

CD	Distribuzione cellulare	Ruolo dell'antigene cui si lega il CD
CD45	Panleucocitario	Lega la tirosina fosfato per l'attivazione mediante legame Ag-recettore del leucocita.
CD44	Panleucocitario	Recettore per il ialuronato, facilita il legame con le cellule endoteliali.
CD18	Panleucocitario	Subunità dell'integrina che si combina con il CD1, gioca un ruolo nell'adesione all'endotelio.
CD11b	Monociti/granulociti	Si associa al CD18 per formare un recettore per coadiuvare l'adesione.
CD14	Monociti	Recettore per LPS che trasduce un segnale per l'aumento dell'esplosione ossidativa e la produzione di citochine proinfiammatorie.
CD3	Tutti i linfociti T	Legano gli Ag e formano un complesso di trasduzione del segnale con il Tcr.
CD4	T helper	Rappresenta il MHC II
CD8	T citotossici	Rappresenta MHC I
CD5	Tutti i linfociti T	Recettore per il CD72, agevola la trasduzione del segnale a seguito del legame con l'antigene.
CD21	B maturi	Recettore della componente C3d del complemento e CD23, se legato attiva la trasduzione del segnale.

Tabella 2.3: CD più studiati all'interno del latte vaccino.

1.4 STRESS OSSIDATIVO E SUOI MARCATORI

1.4.1 Infiammazione e stress ossidativo

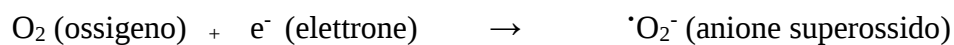
Uno squilibrio tra la formazione di ROS (*reactive oxygen species*) e la disponibilità di antiossidanti necessari per ridurre l'accumulo di tali sostanze nell'organismo porta allo stress ossidativo, il quale a sua volta può danneggiare tutti i tipi di molecole biologiche (RNA, DNA, colesterolo, lipidi, carboidrati e proteine) (Celi & Gabai, 2015; Lorraine M Sordillo & Aitken, 2017).

L'ossigeno molecolare è usato come un accettore universale di elettroni durante la produzione di energia in tutti gli organismi aerobi; invero i radicali liberi rappresentano il prodotto derivante sia dalla catena di trasporto mitocondriale degli elettroni sia dall'azione del NADPH ossidasi (Valko et al., 2007). Possono essere definiti radicali liberi tutte le molecole che posseggono almeno un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno e che di conseguenza portano al trasferimento di elettroni attraverso l'ossidazione o la riduzione (Halliwell & Gutteridge, 1999). I ROS rappresentano una classe di radicali liberi derivati dall'ossigeno molecolare (O_2) o dall'anione superossido ($\cdot O_2^-$), prodotto anch'esso all'interno dei mitocondri o dal NADPH ossidasi di macrofagi o neutrofili (Sorg, 2004). Codesto gruppo di radicali è dotato di effetti positivi per l'organismo se presente in basse concentrazioni; risulta infatti legato alla trasmissione di molti segnali, ma il ruolo più importante lo svolge nel fronteggiare le infezioni. Un'altra funzione benefica dei ROS è rappresentata dal contributo nei processi di differenziazione cellulare e apoptosi (Valko et al., 2006).

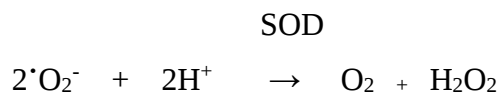
Per arginare gli effetti deleteri dei radicali liberi gli organismi aerobi si sono dotati di antiossidanti (enzimatici e non) atti a bloccarli prima che possano ossidare le macromolecole o a ridurre molecole biologiche già ossidate dai radicali (Sorg, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007). Tra gli antiossidanti enzimatici ritroviamo la superossidodismutasi (SOD), la glutatione perossidasi (GPx) e la catalasi (CAT). Gli antiossidanti non enzimatici sono invece rappresentati da: acido ascorbico (Vitamina C), α -tocoferolo (Vitamina E), glutatione (GSH), flavonoidi, carotenoidi ecc. (Valko et al., 2007).

Come precedentemente accennato l'infiammazione, soprattutto grazie a granulociti neutrofili ed ai macrofagi, è una cospicua fonte di ROS. Infatti, i

granulociti neutrofili e macrofagi, giunti nel sito d'infezione, prendono contatto con il materiale estraneo, lo invaginano all'interno della membrana citoplasmatica formando un fagosoma destinato poi a fondersi con un lisosoma. All'interno del lisosoma sono presenti enzimi proteolitici, idrolitici, lisozima e gli enzimi coinvolti nel *burst* respiratorio ovvero la SOD e la mieloperossidasi (MPO) per i neutrofili e la SOD e CAT per i macrofagi (Poli & Bonizzi, 2011). Durante la fagocitosi viene inoltre attivato l'enzima NADPH ossidasi (presente sulla membrana del fagosoma), il quale catalizza la formazione di anione superossido a partire dall'ossigeno molecolare:



L'anione superossido può in seguito reagire con molte molecole per andare a formare altri ROS. Particolarmente interessante è la reazione catalizzata dalla SOD all'interno del mitocondrio per andare a formare il perossido d'idrogeno (H_2O_2) mostrata nella seguente equazione (Sorg, 2004):



Inoltre, alcuni metalli quali ferro (Fe) e rame (Cu) possono reagire con $^{\bullet}\text{O}_2^-$ e H_2O_2 per formare un ancora più reattivo radicale idrossile ($\text{OH}^{\bullet}$) (Halliwell & Gutteridge, 2007). La MPO riesce a catalizzare l'ossidazione dello ione cloro (Cl^-) attraverso l' H_2O_2 formando l'acido ipocloroso (HOCl) e $\text{OH}^{\bullet}$ (Sorg, 2004; Halliwell & Gutteridge, 1999). Altro tipo di specie radicaliche prodotte durante l'infiammazione sono le specie reattive dell'azoto (*reactive nitrose species*, RNS), delle quali i macrofagi attivati rappresentano i maggiori produttori. All'interno dei macrofagi si forma l'ossido nitrico ($\text{NO}^{\bullet}$), attraverso l'attivazione dell'enzima *inducible nitric oxide synthase* o iNOS, oltre all' $^{\bullet}\text{O}_2^-$. Quest'ultimo si unisce al $\text{NO}^{\bullet}$ per dare vita al perossinitrito (ONO_2^-), una specie radicalica più attiva delle due precedenti (Piroddi et al., 2007; Gào & Schöttker, 2017).

Infine, altre fonti di ROS durante l'infiammazione sono due enzimi deputati alla formazione di prostaglandine, leucotireni e trombossani: lipossigenasi (LOX) e ciclossigenasi (COX). Le COX e le LOX metabolizzano l'acido arachidonico, reso

disponibile dalle membrane cellulari attraverso l'uso di fosfolipasi, formando le molecole in precedenza citate insieme alle ROS (De Carvalho et al., 2008).

E' stato già spiegato all'inizio del capitolo che lo stress ossidativo palesa i suoi effetti negativi su tutte le molecole biologiche dell'organismo, portano alla formazione di molti prodotti dell'ossidazione (Celi & Gabai, 2015). I prodotti dell'ossidazione di lipidi, proteine, aminoacidi ed acidi nucleici sono molto stabili nel tempo, mentre sia ROS sia RNS hanno un'emivita breve (alcuni secondi), ciò ha spinto ad utilizzare i prodotti dell'ossidazione di queste molecole come marcatori dello stress ossidativo. I prodotti dell'ossidazione delle proteine e degli aminoacidi rivestono il ruolo più importante come marcatori dello stress ossidativo, poiché risultano più stabili ed affidabili rispetto agli altri prodotti (Dalle-Donne et al., 2005). Un altro aspetto che favorisce le proteine come marcatori è la capacità che alcune di loro hanno di accumulare danni ossidativi sui loro residui; infatti, secondo alcuni studi le proteine svolgerebbero un'attività neutralizzante nei confronti del 50-75% dei radicali liberi (Davies et al., 1999; Dalle-Donne et al., 2005). Metodiche per la rilevazione di queste molecole sono state ampiamente testate in umana in primis per pazienti con insufficienza renale cronica (Colombo et al., 2017; Marian Valko et al., 2007).

1.4.2 Advanced Oxidative Protein Products (AOPP)

Come si può intendere dal loro nome le "*Advance Oxidative Protein Products*" sono il frutto dell'ossidazione di alcune proteine. Le AOPP vengono a formarsi dalla reazione di proteine plasmatiche (soprattutto albumine) con ossidanti clorurati tipo HOCl e cloramine e sono tra i marcatori più utilizzati nella misurazione del danno ossidativo arrecato da molte patologie. Contenuti all'interno delle AOPP sono soprattutto le ditirosine, pentosidine e gruppi carbonilici (Selmeç, 2011). La formazione di questi prodotti può avvenire in due modi differenti: una mieloperossidasi-dipendente, attraverso l'azione di MPO e HOCl, e l'altra mieloperossidasi-indipendente (Colombo et al., 2017; Capeillère-Blandin et al., 2006). Un interessante aspetto del comportamento delle AOPP riguarda la capacità intrinseca di agire come mediatori dell'infiammazione e stimolare l'esplosione respiratoria dei macrofagi (Witko-Sarsat et al., 1998); da ciò si potrebbe evincere che

le AOPP oltre ad essere un prodotto dello stress ossidativo sono anche un fattore perpetuante. Un problema riscontrato durante la determinazione delle AOPP nel plasma è il loro sovradosaggio a causa di alti contenuti di trigliceridi e lipoproteine, questi vanno infatti eliminati prima dell'inizio delle procedure d'analisi (Selmeci, 2011). Più recentemente si è sviluppato un metodo che utilizza l'acido citrico per solubilizzare i lipidi contenuti nel plasma (Hanasand et al., 2012).

1.4.3 Carbonili

ROS e RNS possono creare stress ossidativi diretti nei confronti di residui di lisina, arginina, o treonina oppure attraverso reazioni secondarie tra residui di cisteina, istidina o lisina e composti reattivi carbonilici (formatisi in reazioni di lipossidazione e glicossidazione). Tutti questi aminoacidi sono dotati di gruppi carbonilici (aldeidi e chetoni), che a seguito del danno subito (primario o secondario che sia) portano alla formazione di derivati carbonilici proteici (Galli, 2007; Stadtman & Levine, 2003). Anche i carbonili vengono utilizzati al pari delle AOPP come marcatori di ossidazione proteica poiché il loro danno è irreversibile e si traduce o in una digestione proteolitica o nell'accumulo di queste proteine danneggiate (Dalle-Donne et al., 2005; Berlett & Stadtman, 1999; Celi & Gabai, 2015), che sono quindi disponibili ad essere saggate attraverso le analisi di vari fluidi corporei. Tuttavia, la misurazione dei carbonili, a differenza delle AOPP, può essere soggetta a più facili errori poiché alcune proteine possono avere assorbanza simile al DNPH, sostanza con cui viene trattato il campione durante il saggio per i carbonili (Yan, 2013). Caratteristica che va a scapito dei carbonili come biomarcatori è il fatto che essi possono essere prodotti da molte altre reazioni non rappresentando quindi una spia specifica di stress ossidativo (Dean et al., 1997; Winterbourn, 2002).

1.4.5 Carbonili ed AOPP come marcatori di mastiti

Enzimi comunemente prodotti dall'epitelio secernente mammario e dai leucociti risiedenti nella mammella quali lattoperossidasi, xantino ossidasi, ipotiocianato e MPO (soprattutto durante le infiammazioni) sembrano apportare danni ossidativi alle proteine del latte (Silanikove et al., 2005). Quest'aspetto sembra essere

particolarmente interessante soprattutto perché l'analisi delle AOPP e dei carbonili presenti nel latte possono riflettere lo stato di salute della mammella, senza tuttavia rappresentare una procedura diagnostica invasiva (Celi & Gabai, 2015). Studi preliminari hanno dimostrato che il contatto tra proteine del latte a dosi crescenti di HOCl (rapporto proteine/HOCl da 0,3 a 3 $\mu\text{mol/mg}$) inducono un aumento del 30% delle AOPP e fanno aumentare da tre a sei volte i carbonili (Gabai et al., 2015). Inoltre, si è rilevata una connessione tra livelli di AOPP nel latte e conta delle cellule somatiche (Guzzo et al., 2015). Tutti questi aspetti sommati assieme portano a pensare che l'analisi delle AOPP e dei carbonili possono essere un interessante strumento d'indagine dello stato infiammatorio della mammella, fermo restando che l'aumento di tali sostanze può essere influenzata anche da una particolare situazione metabolica della bovina (bilancio antiossidanti-ossidanti), dal numero di parti e dal periodo della lattazione (Talukder et al., 2015; Wachter et al., 1999).

2. SCOPO DELLA TESI

Molti al giorno d'oggi ironizzano sul fatto che la vacca da latte può essere vista come l'appendice della mammella e non viceversa (Hibbit et al., 2004). Dal punto di vista economico possiamo affermare che suddetta frase risulta vera poiché la mastite rappresenta, in ambito veterinario, la patologia animale più devastante in termini economici a livello mondiale. E' stato calcolato che mediamente una mastite nei primi 30 giorni di lattazione può costare all'allevatore un totale di 444\$ in termini di perdite dirette ed indirette (Rollin, Dhuyvetter, & Overton, 2015). Nel tempo sono stati testati molti metodi per la diagnosi delle mastiti, alcuni ancora in auge, altri, invece, caduti in disuso. Tra i test di spicco ritroviamo: il *California Mastitis Test*, l'esame batteriologico, le varie metodiche di conta delle cellule somatiche (SCC), la rilevazione della conducibilità del latte, la DCC attraverso citologico e citofluorimetria. Nuove ricerche sono state portate avanti grazie alla *multiplex* e *real time* PCR, ai micro-RNA (miRNAs) ed alla proteomica.

Un nuovo campo di studi può essere rappresentato dalla rilevazione dei marcatori di stress ossidativo quali le *Advance oxidative protein products* e dai carbonili. Le AOPP ed i carbonili possono essere degli interessanti biomarcatori dello stato di salute anche della mammella nonché spie di stadi infiammatori sub-acuti, sebbene pochi studi sono stati portati avanti in questo senso (Gabai et al., 2015). I risultati finora ottenuti lasciano ben sperare sulla bontà dei carbonili e delle AOPP come marcatori di mastiti sia cliniche sia subcliniche.

Ha suscitato particolare interesse la connessione tra gli effetti di HOCl nel latte ed il rilevamento di un conseguente aumento di AOPP e carbonili, oltre al rilevamento di una correlazione diretta fra AOPP e cellule somatiche nel latte bovino (Guzzo et al., 2015; Gabai et al., 2014). Va inoltre considerato che l'HOCl viene prodotto in grande quantità dai neutrofili durante le mastiti e che tale stato infiammatorio porta anche ad un aumento delle cellule somatiche nel latte. A seguito di queste premesse il seguente studio si prefigge di verificare l'esistenza di eventuali relazioni tra il contenuto delle varie popolazioni leucocitarie nel latte e l'aumento di marcatori di ossidazione proteica. Infine, si vuole ulteriormente indagare sulla possibilità d'utilizzo di suddette molecole come marcatori di mastite.

3. MATERIALI E METODI

3.1 LUOGHI DI PRELIEVO DEI CAMPIONI

3.1.1 Azienda Agricola Marangoni Renato e Vittorio S.s.

La prima serie di campionamenti utili alla tesi sono stati presi presso l'Azienda Agricola Marangoni Renato e Vittorio S.s., di Montecchio Precalcino (VI). Questa realtà conta 85 capi di razza Pezzata Rossa, Frisona e Bruna, di cui 45 in lattazione e 40 tra manze, manzette e vitelli. I capi sono tenuti a stabulazione fissa, con locali appositi per le manze e per i vitelli. Il sistema di mungitura è meccanico con impianto a lattodotto. La produzione giornaliera media per capo è di 21,7 Kg, con due mungiture giornaliere. L'alimentazione è a base di fieno di sfalcio, medica secca e falciata in rapporto 1:1 con farina di mais e nucleo.

3.1.2 Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo"

Una seconda serie di campioni è stata raccolta presso l'Azienda Agraria Sperimentale di "Lucio Toniolo" (PD). Le bovine appartengono alla razza Pezzata Rossa. La stalla delle vacche è dotata di 62 cuccette con capi a stabulazione libera e paddock esterno annesso alla struttura. Le bovine in lattazione sono 32 con media di produzione giornaliera di 23 Kg, presenti inoltre 4 capi in asciutta, 5 manzette e 4 vitelle. Le bovine in asciutta e le manze gravide vengono messe in box multipli in uno stabile a parte, anche i vitelli vengono mantenuti in un edificio separato. La sala di mungitura, in una struttura adiacente alla stalla, è a spina di pesce con sei postazioni per lato di cui solo sei attive. Nella stessa struttura, oltre al locale per la refrigerazione del latte, è presente anche un ufficio prospiciente dotato di un processore DeLaval e computer per la registrazione dei dati. La mungitura avviene due volte al giorno.

L'alimentazione è costituita da unifeed preparato a secco con carro miscelatore usando come base foraggera il fieno di prato stabile e di medica (© 2017 Università di Padova).

3.1.3 Azienda Agricola Arcobaleno di Possamai Flavio e Maurizio

L'ultima serie di campioni è stata prelevata presso l'azienda Azienda Agricola Arcobaleno di Possamai Flavio e Maurizio. Questa realtà conta 300 capi totali, di cui: 135 in lattazione, 25 in asciutta, 110 manze e 20 vitelli. Le bovine appartengono alle razze Pezzata Rossa e Frisona, la media di produzione giornaliera è di 32 Kg capo. La stabulazione è libera, con locali appositi per manze e vitelli. La mungitura è volontaria e viene attuata dal robot DeLaval® VMS (Voluntary Milking System). La struttura è dotata di una sala parto a cui gli animali hanno accesso prima che inizino il travaglio, la permanenza dura quattro giorni per le primipare ed otto per le pluripare. La mungitura in sala parto viene svolta alla posta con carrello. Terminato questo periodo le bovine rientrano nei box di lattazione dove tornano ad essere munte dal robot sopracitato dalle due alle tre volte al giorno.

L'alimentazione, ottenuta attraverso carro miscelatore, è differenziata in base all'animale ed allo stato di lattazione. Qui sotto, nella tabella 3.1, si ritrova la dieta delle vacche in lattazione.

Ingrediente	Kg/capo
Insilato di mais	16,0
Farina di mais	4,7
Acqua	6,2
Erba medica	4,0
Nucleo Arcobaleno LinoE	3,0
Medica fasciata	2,5
Fieno	2,0
Loietto	2,0
Integratore	0,9

Tabella 3.1: formulazione del carro miscelatore per l'alimentazione delle vacche in lattazione.

Inoltre, il robot eroga durante ciascuna mungitura 3,48 kg di mangime complementare per vacche da latte.

3.2 RACCOLTA CAMPIONI

3.2.1 Identificazione e selezione degli animali

L'identificazione e selezione dei capi in tutte e tre le strutture è stata effettuata basandosi sui valori di SCC, in modo da ottenere una buona variabilità nella distribuzione della conta delle cellule somatiche, ed avere un gruppo di controllo caratterizzato da un basso numero di cellule somatiche ($SCC < 1 \cdot 10^5$ cellule/ml) ed una buona numerosità. La suddivisione dei soggetti in gruppi omogenei è avvenuta a posteriori, secondo i criteri descritti nel Paragrafo 3.4.2.

Nel caso dell'Azienda Agricola Marangoni Renato e Vittorio Ss. la selezione dei capi è avvenuta basandosi sull'ultimo controllo funzionale delle cellule somatiche individuali (attività di controllo svolta dall'Associazione Italiana Allevatori, A.I.A.); venivano scelti capi con il controllo funzionale avvenuto nell'ultima settimana di modo che la SCC corrispondesse al reale stato della mammella. Una parte del latte prelevato veniva destinata al laboratorio di Veneto Agricoltura presso Thiene affinché venisse determinata la SCC da utilizzare nel nostro studio. Per quanto riguarda l'Azienda Agraria Sperimentale il controllo delle cellule somatiche avviene sempre a cadenza mensile attraverso i piani di controllo funzionale attuati dall'Associazione Veneta Allevatori. I campioni raccolti in questa struttura erano stati presi 3-4 giorni dopo il controllo funzionale; le SCC collegate al campione erano quindi riferite all'ultimo controllo funzionale. Infine, gli animali da campionare scelti nell'Azienda Agricola Arcobaleno sono stati selezionati in base alla SCC attuata quotidianamente dal robot DeLaval® VMS munito del software DelPro® 3.0. Il sistema di conta delle cellule somatiche è l'OCC DeLaval®, il quale utilizza un sensore ottico simile alla metodica DCC; una fotocamera digitale rileva il numero di nuclei cellulari e li rapporta alla quantità di latte analizzata. In questo caso il valore delle cellule somatiche collegato al campione è stato ottenuto facendo la media aritmetica della SCC delle ultime tre mungiture compresa quella che coincide con il campionamento (va sottolineato che le vacche venivano munte un media 2/3 volte al giorno).

3.2.2 Prelievo campioni

I campioni di latte sono stati ottenuti in accordo con la direttiva generale in vigore nella Comunità Europea riguardante il benessere animale (DE 86/609/CEE). I campioni dell'Azienda Agricola Marangoni Renato e Vittorio S.s. venivano prelevati dal secchio di mungitura dopo aver miscelato il latte e facendo attenzione a non pescare il campione dalla superficie ricca di panna. Il campione è stato poi trasferito in provette Falcon® da 50 ml. Nell'Azienda Agraria Sperimentale il latte è stato prelevato, attraverso l'utilizzo di un lattometro, da una valvola per i campionamenti presente vicino all'attacco del gruppo di mungitura al circuito ed in seguito trasferito in una Falcon® da 50 ml. Per quanto riguarda l'Azienda Agricola Arcobaleno il latte individuale è stato ottenuto dalla mungitura manuale di ciascuno dei capezzoli all'interno della provetta Falcon® da 50 ml.

3.3 ESAMI DI LABORATORIO

3.3.1 Citofluorimetria

La citofluorimetria è stata eseguita servendosi di un citometro Partec CyFlow® Space con annesso computer munito di software FlowMax® per acquisire, analizzare e processare i dati. Il citofluorimetro, di cui seguono due immagini schematiche (Figura 3.1 e 3.2), è dotato di tre fonti di luce: diodo laser blu (λ 488 nm), diodo laser rosso (λ 638 nm) e LED UV (λ 365 nm).

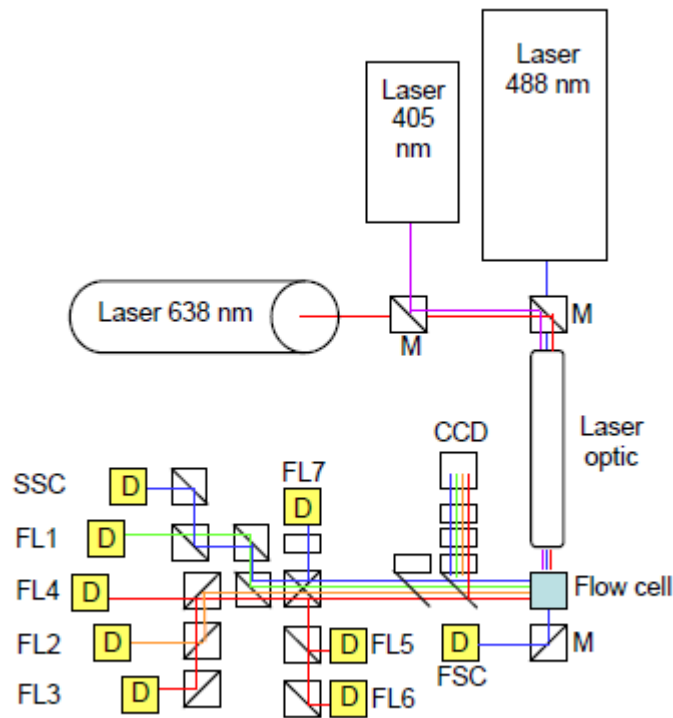


Figura 3.1. Schematizzazione del sistema composto dalle fonti luminose (laser), specchi (M) e rilevatori (D) di fluorescenze, SCC e FSC. Il sistema è dotato anche di una fotocamera (CCD) che ha il compito di controllare il fuoco dell'obiettivo. I tre laser illustrati nella figura hanno lunghezza d'onda differente rispetto a quelli del nostro citofluorimetro, questo perché potevano essere cambiati a seconda delle necessità dell'acquirente.

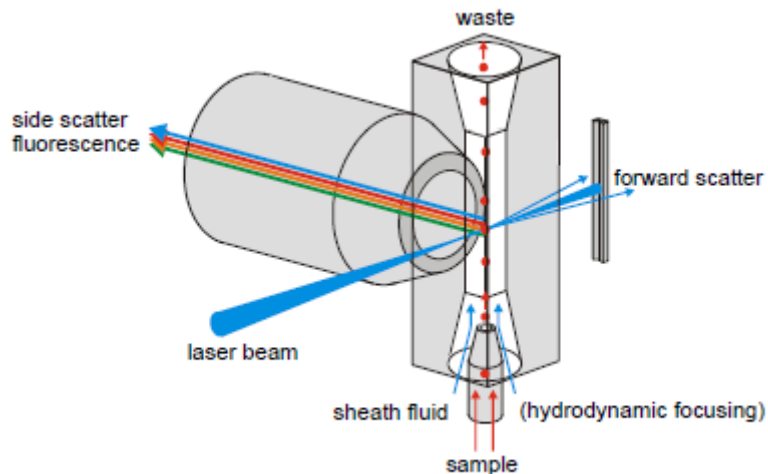


Figura 3.2. Qui illustrato l'incontro tra il campione (sample) ed il raggio laser (laser beam); la luce diffratta viene rilevata dal sensore per il forward scatter, la luce rifratta e le fluorescenze vengono raccolte dall'obiettivo posto a 90° rispetto a fluido, raggio laser e forward scatter.

La metodica è stata eseguita nella stessa giornata del campionamento; la citometria a flusso non è una tecnica affidabile su campioni congelati o refrigerati per più di un giorno, le cellule infatti andrebbero incontro a morte e lisi inficiando il risultato (una cellula lisata potrebbe essere contata come due o più eventi distinti) (Li et al., 2015).

Le soluzioni e gli Ab utilizzati per processare i campioni sono le seguenti:

1. Tampone fosfato salino a concentrazione 1 mM (Phosphate Buffered Saline 1X, PBS 1X), viene utilizzato per conservare le cellule durante la metodica o riportarle a volume
2. RPMI+Azide+FBS → RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), l'azide serve per evitare che il complesso Ag-Ab non s'internalizzi, polarizzi o distacchi, FBS (Fetal Bovine Serum) è usato come preservante per le cellule
3. PBS+Azide → Verrà utilizzato per le diluizioni anticorpali
4. Sheath fluid → Fluido utilizzato per pulire la linea dei fluidi del citofluorimetro ad acquisizione conclusa.

La procedura utilizzata per la preparazione dei campioni di latte è la seguente.

Il latte è prima ripreso all'interno del contenitore usato per campionare, vengono prese due provette da centrifuga da 50 ml (Nest®) e versati in ciascuna 25 ml di latte aggiungendo un ugual volume di PBS 1X. Le provette vengono chiuse e centrifugate a 1500 RPM, per 15 minuti a 4 °C (Eppendorf 5810 R Centrifuge®). Terminata la

centrifuga viene aspirata la panna affiorata ed il surnatante. Rimane sul fondo della provetta un pellet in cui risiede gran parte del contenuto cellulare del campione, esso viene sospeso con del PBS 1X oppure grazie al surnatante rimasto sul fondo delle provette. Una volta risospesi, entrambi i pellet vanno trasferiti all'interno di un'unica provetta da 15 ml (Nest®), aggiungendo in seguito 14 ml di PBS 1X e ricentrifugando con le stesse modalità suddette. Terminata la centrifuga va eliminato il surnatante e risospeso il pellet aggiungendo RPMI+Azide+FBS ed agitando con il Vortex (ARGO LAB MIX Mixer®). Nel caso in cui si tratti di un campione scarsamente cellulare (informazione ottenuta dalla SCC) vengono usati 500 µl di RPMI+Azide+FBS, mentre se il campione possiede un'alta cellularità viene diluito con 1 ml della stessa soluzione. Infine, vengono messi 50 µl della sospensione ottenuta in un tubo da citofluorimetria (3.5 Ml Plastic Tubes Sarstedt®) dove sono già stati posti gli Ab diluiti.

Parallelamente alla processazione dei campioni, gli anticorpi coniugati vengono diluiti con PBS+azide all'interno di microtubi Eppendorf Safe-Lock® da 1,5 ml come mostrato nella Tabella 1.4.

Anticorpo contro	Fluoroforo	Clone anticorpale	Tipo anticorpale	Specie d'origine	Ditta produttrice	Diluizione utilizzata
CD11b	FITC	CC126	Monoclonale	Topo	GeneTex®	1:100
CD14	PE	TÜK4	Monoclonale	Topo	Abcam®	1:25
CD44	APC	IM7	Monoclonale	Ratto	Invitrogen®	1:25
CD21	PE	LT21	Monoclonale	Topo	GeneTex®	1:50
CD4	PE	CC8	Monoclonale	Topo	GeneTex	1:50
CD8	Alexa Fluor® 647	CC63	Monoclonale	Topo	AbD Serotec®	1:50

Tabella 3.3 Anticorpi e fluorofori utilizzati nel corso dello studio.

I tubi contenenti gli Ab tal quali di partenza e i microtubi Eppendorf® Safe-Lock di Ab diluiti vengono mantenuti in ghiaccio durante tutta la durata dei precedenti passaggi ed anche dei futuri. È importante che sia gli Ab tal quali sia quelli diluiti vengano agitati prima di qualsiasi trasferimento per renderne omogenea la presenza all'interno della soluzione. In seguito, vengono preparati 4 tubi da citofluorimetria al cui interno vengono posti 50 µl cadauno di Ab diluiti con le specifiche combinazioni:

1. Tubo controllo (Cellule sole): sospensione cellulare addizionata con 50 µl PBS+Azide, senza anticorpi
2. Tubo CD11b+CD14+CD44

3. Tubo CD21+CD44

4. Tubo CD4+CD8

Dopo aver aggiunto 50 µl di sospensione cellulare all'interno, tutti i tubetti vengono incubati al buio per 20 minuti in frigorifero (4°C). Una volta terminata suddetta fase si aggiungono 500 µl di PBS 1X a ciascun tubetto e si centrifuga a 1100 RPM per 10 minuti a 4 gradi. Dai tubi, estratti dalla centrifuga, viene eliminato il surnatante. Sono poi aggiunti 900 µl di PBS 1X a ciascun tubo e la soluzione cellulare viene risospesa tramite agitazione manuale o con Vortex prima che il campione venga inserito nel sistema d'acquisizione del citometro.

L'acquisizione dei dati avviene grazie al citometro Partec CyFlow® munito di tre laser a diversa lunghezza d'onda. Il programma FlowMax® va impostato affinché vengano contati 20.000 eventi nell'insieme R1, tale *gate* viene definito sul dot plot morfologico.

3.3.2 Preparazione campioni per analisi di proteine totali, AOPP e carbonili

La parte di campione (latte intero) non utilizzata per l'analisi citofluorimetrica è stato conservato in provette Falcon® da 50 ml alla temperatura di -80°C per la successiva determinazione di AOPP, carbonili e proteine totali (CT e PT). Per ottenere siero di latte, utilizzato per le analisi appena citate, 10 ml di latte intero sono stati centrifugati a 5.000 g, per 15 minuti alla temperatura di 4°C (Thermo Scientific® SL 16R Centrifuge). La frazione grassa affiorata è stata in seguito eliminata ottenendo latte scremato (*skim milk*). Il latte scremato è stato distribuito in provette da 2ml ed ultracentrifugato (Beckman Coulter's Optima L-90K Ultracentrifuge®) a 25.000 g, per 30 minuti a 4°C per eliminare la caseina ottenendo il siero di latte (*whey protein*), posto poi in Eppendorf® da 1 ml. Tutte le frazioni ottenute sono state conservate a -80°C fino al momento dell'analisi (Figura 3.3).

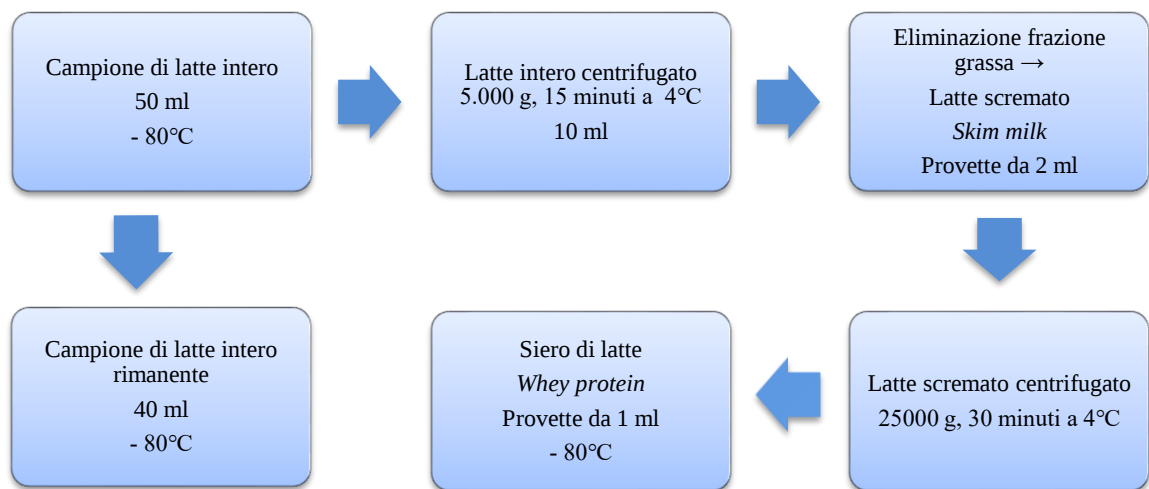


Figura 3.3. Diagramma riassuntivo dei cicli di centrifugazione per la preparazione del campione alle analisi successive.

3.3.3 Dosaggio delle proteine totali

Le proteine totali sono state dosate utilizzando il metodo BCA (bicinchoninic acid assay), seguendo le istruzioni contenute nel kit: *PierceTMBCA ProteinAssay Kit* (Pierce Biotechnology 3747 N. Meridian Road, PO Box 117 Rockford, IL 61105 USA). La preparazione della proteina standard (soluzione A, 2 mg/ml di Albumina bovina) con la quale è stata allestita la curva di taratura, indicata in Tabella 3.4.

Soluzione di calibrazione	Volume di diluente (µl)	Volume di BSA (µl)	Concentrazione finale (µg/ml)
A	0	300 di soluzione A	2000
B	125	375 di soluzione A	1500
C	325	325 di soluzione A	1000
D	175	175 di soluzione B	750
E	325	325 di soluzione C	500
F	325	325 di soluzione E	250
G	325	325 di soluzione F	125
H	400	100 di soluzione G	25
I	400	0	0= bianco

Tabella 3.4 Preparazione delle diluizioni di proteina standard per la curva di taratura.

Il dosaggio è stato eseguito su una piastra da 96 pozzetti (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences®, Shelton, CT, USA) dove sono stati depositati, in pozzetti differenti, rispettivamente 25 µl di proteina standard e 25 µl di siero di latte diluito 20 volte con PBS. Dopo l'aggiunta di 200 µl di reagente, preparato mescolando le soluzioni contenute nel Kit nel rapporto di 50:1, la piastra è stata agitata e posta a 37°C per 30 minuti. I campioni sono stati letti sul lettore di micropiastre (Packard Instrument, Meriden®, CT, USA) a 570 nm. La concentrazione proteica è stata calcolata utilizzando l'equazione della retta di taratura ($y = 0.001 \times 0.091$).

3.3.4 Determinazione delle AOPP

Per la determinazione delle AOPP sono state utilizzate le seguenti soluzioni:

- Cloramina-T 10 mM (CT 10 mM) → 28,189 mg di cloramina-T + 10 ml H₂O bidistillata
- Potassio ioduro 1,16 M (KI) → 1,9256 g di potassio ioduro + 10 ml H₂O bidistillata
- PBS 20X → PBS 20 mM.

Le AOPP sono misurate utilizzando il metodo spettrofotometrico di Witko-Sarsat con alcune modifiche (Witko-Sarsat et al., 1996, Witko-Sarsat et al., 1998). Ci si è serviti di un lettore di micropiastre (Packard Instrument, Meriden, CT, USA). La curva di calibrazione (0 a 200 µmol/litro) è stata allestita con cloramina-T (tosilclorammina sodica N-cloro-4-toluensolfonammidato di sodio; Fluka, St. Louis, MO, USA) 10 mM, diluita in PBS 20 mM, pH 7.4 (Tabella 3.6). In seguito, sono stati posti nella piastra da 96 pozzetti (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) 200 µl/pozzetto della soluzione di cloramina-T standard con 10 µl di KI e 20 µl di acido acetico. Nella stessa piastra, in cui è stata allestita la curva di taratura, sono stati caricati in ordine: 100 µl di PBS 20X, 100 µl di siero di latte e infine 20 µl di acido acetico. Per chiarezza si rimanda alla Tabella 3.5 ed alla Figura 3.4. Dopo agitazione, l'assorbanza è letta, dopo due minuti, allo spettrofotometro a 340 nm contro il bianco contenente solo PBS 20X, potassio ioduro, acido acetico.

Soluzione	Bianco	Standard	Campione
PBS 20 mM	200 µl	X	100 µl
Cloramina-T	X	200 µl	X
Plasma	X	X	100 µl
KI	10 µl	10 µl	X
Acido Acetico	20 µl	20 µl	20 µl

Tabella 3.5. Schema di caricamento della piastra per il dosaggio delle AOPP. La lettera "X" indica in quali pozzetti non è stata caricata la soluzione.

La cloramina-T standard assorbe a 340 nm in modo lineare con un intervallo da 0-100 µmol/litro con una sensibilità di 3.125 µM e la concentrazione delle AOPP è espressa come micromoli per litro di cloramina-T equivalenti.

Soluzioni scalari cloramina-T	Concentrazione cloramina-T	Diluizione scalare
CT 7	200 $\mu\text{mol/litro}$	20 μl CT 10 mM + 980 μl PBS
CT 6	100 $\mu\text{mol/litro}$	500 μl CT7 + 500 μl PBS
CT 5	50 $\mu\text{mol/litro}$	500 μl CT6 + 500 μl PBS
CT 4	25 $\mu\text{mol/litro}$	500 μl CT5 + 500 μl PBS
CT 3	12,5 $\mu\text{mol/litro}$	500 μl CT4 + 500 μl PBS
CT 2	6,25 $\mu\text{mol/litro}$	500 μl CT3 + 500 μl PBS
CT 1	3,125 $\mu\text{mol/litro}$	500 μl CT2 + 500 μl PBS
CT 0	0 $\mu\text{mol/litro}$	Solo 500 μl PBS

Tabella 3.6. Diluizioni scalari di cloramina-T, per chiarezza riguardo la voce "CT 10 mM" si rimanda all'inizio paragrafo.

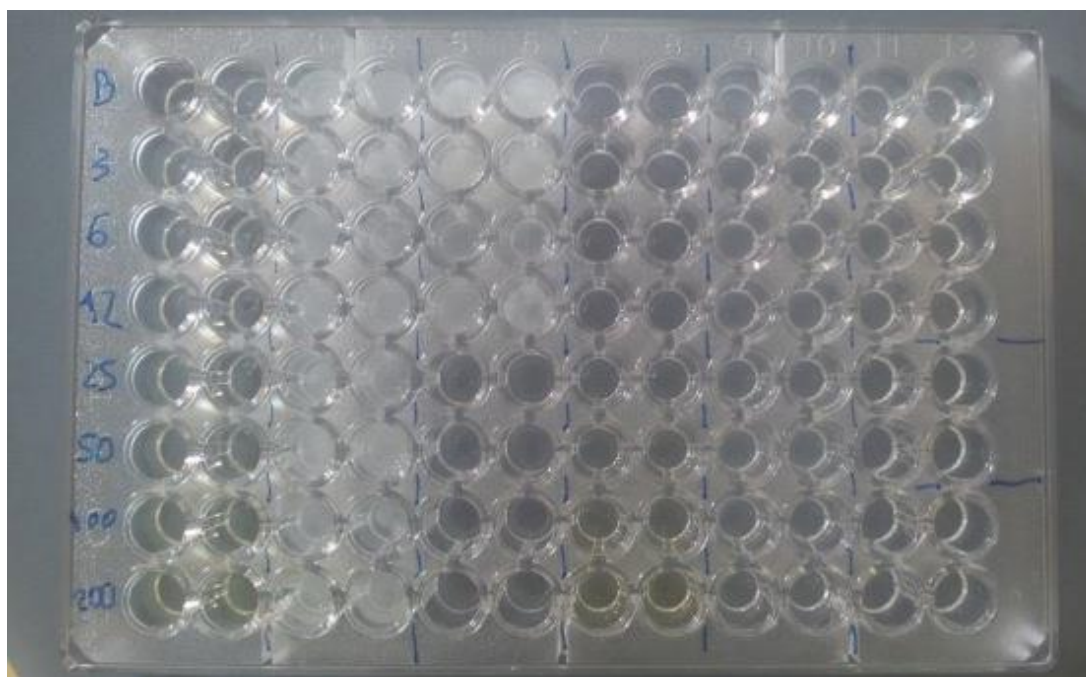


Figura 3.4. Fotografia di una piastra da 96 pozzetti (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) dopo il caricamento. Le prime due colonne sulla sinistra contengono le diluizioni scalari della soluzione standard. I numeri affianco delle due colonne indicano concentrazioni ($\mu\text{mol/litro}$) in aumento dall'alto verso il basso. La lettera "B", che identifica i primi due pozzetti in alto, si riferisce alla diluizione CT 0 della tabella 3.6 (contiene solo 200 μl di PBS 20 mM, 20 μl di ac. Acetico e 10 μl di KI). Gli ultimi otto pozzetti in fondo a destra sono stati caricati con dei bianchi. I restanti pozzetti sono stati caricati con i campioni dall'alto al basso, da sinistra a destra. Sia il campione sia la soluzione standard sono stati posti in due pozzetti affiancati.

3.3.5 Determinazione dei carbonili totali

La misurazione dei carbonili proteici in seguito alla loro derivatizzazione con DNPH (2,4-dinitrofenilidrazina; Sigma-Aldrich Co., St, Louis, MO) è la metodica

più utilizzata per la determinazione delle proteine ossidate (Levine R.L. et al., 1990; Reznick et al., 1994; Dalle-Donne et al., 2003). Le soluzioni (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) utilizzate per il saggio enzimatico sono schematizzate nella Tabella 3.5.

Soluzione	Composizione
DNPH 10 mM	24,77 mg DNPH + 12,5 ml HCl 2,5 N
Etanolo: Acetato di etile	50 ml ET.OH + 50 ml ET.Ac
TCA 10%	10 g TCA + 100 ml H ₂ O bidistillata
TCA 20%	20 g TCA + 100 ml H ₂ O bidistillata
Potassiodiidrogeno fosfato 20 mM (KB), pH 2,3	408,3 mg KH ₂ PO ₄ + 150 ml H ₂ O bidistillata
HCl 2,5 N	20,8 ml HCl 37% + 79,2 ml H ₂ O bidistillata

Tabella 3.7 Soluzioni preparate per il saggio enzimatico utilizzato per la determinazione dei carbonili totali.

I campioni di siero di latte sono stati suddivisi in due aliquote da 150 µl ciascuna; una destinata al controllo negativo e l'altra destinata ad essere trattata con DNPH. Ricordiamo che il DNPH reagisce con i carbonili proteici, condensandosi nel derivato cromoforo idrazone, identificabile a 380 nm. Ad entrambe le aliquote è stato aggiunto 1 ml di acido tricloroacetico al 10% (TCA 10%) a 4°C per far precipitare le proteine sul fondo delle provette. Dopo 10 minuti il campione è stato centrifugato a 4°C, per 10 minuti a 5000 g. Successivamente veniva eliminato il surnatante, ed al pellet venivano aggiunti 0,5 ml di DNPH 10 mM in HCl 2.5 N nella serie di campioni da derivatizzare e 0,5 ml di HCl 2,5 N nei controlli negativi. I campioni, dopo essere stati risolubilizzati, venivano posti al buio per un'ora (a temperatura ambiente) ed agitati ogni 10 minuti.

Dopo questo passaggio ad ogni aliquota, sia quelle precedentemente trattate con DNPH 10 mM sia quelle trattate solo con HCl, sono stati aggiunti 0.5 ml di acido tricloroacetico 20%. Tutti i campioni sono stati agitati con Vortex, lasciati in ghiaccio per 10 minuti e poi centrifugati a 4°C, a 5000 g per 15 minuti. Eliminato il surnatante, il pellet proteico è stato risolubilizzato tre volte con 1 ml di etanolo/acetato di etile per rimuovere l'eccesso di DNPH. A ciascuna di queste tre risolubilizzazioni è seguita sempre una centrifugazione a 4°C, per 10 minuti a 5000 g. A seguito dell'ultima centrifuga il pellet è stato ripreso con 1 ml di KB 20 mM e lasciato a 37°C per 15 minuti. Le aliquote sono state nuovamente centrifugate ed il contenuto in carbonili (C) è stato determinato con lo spettrofotometro (JASCO V-630

Spectrophotometer®) ad una assorbanza di 380 nm (Abs 380 nm), usando il coefficiente di estinzione molare (assorbività molare, ϵ) della DNPH: 22,000 M⁻¹ cm⁻¹ (Levine et al., 1994) secondo le equazioni seguenti:

$$\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 1 / \epsilon = 45,45 \text{ nmol/ml}$$

$$C = \text{Abs}/\epsilon = \text{Abs 380 nm} / 45,45 \text{ nmol/ml}$$

I valori sono stati rapportati alla concentrazione proteica calcolata mediante BCA (nmol/mg di proteine) (Paragrafo 3.3.3).

3.4 ELABORAZIONE DATI ED ANALISI STATISTICA

3.4.1 Elaborazione dei dati citofluorimetrici

Al fine di ottenere le percentuali riguardanti le sottopopolazioni leucocitarie i dati ottenuti al citometro vanno analizzati servendosi del programma FlowMax®. Il numero di quadranti visualizzati può essere impostato a piacere, come le grandezze presenti in ascissa/ordinata ed il tipo di diagramma (dot-plot, istogrammi ed isodensitometrici). Il primo grafico di cui ci si avvale in uno studio citofluorimetrico è il dot-plot morfologico, con in ascissa la grandezza (FSC), che ci riporta informazioni riguardanti la grandezza delle popolazioni cellulari, mentre in ordinata troviamo la grandezza (SCC), che indaga la complessità e lobularità intrinseca della cellula. Avvalendosi di queste due grandezze si possono già evidenziare le varie sottopopolazioni leucocitarie e racchiuderle nell'insieme R_1 , che rappresenterà il "gate" di riferimento all'interno del quale si studierà la positività delle cellule agli Ab marcatori. Nel grafico SCC/FSC (Figura 3.4) i granulociti si localizzano nel primo terzo dell'ascissa (FSC), poiché rappresentano una popolazione di medie-piccole dimensioni, e nella parte medio-alta dell'asse y (SCC), infatti il nucleo ed il citoplasma dei granulociti riservano un'elevata complessità soprattutto se attivi. I monociti-macrofagi si ritroveranno invece al di sotto dei granulociti sull'ordinata (nucleo tondeggianti, ma abbondante citoplasma vacuolizzato). Va specificato che il profilo morfologico dei monociti è differente nel latte rispetto al sangue periferico. I monociti, infatti, una volta fuoriusciti dai vasi si attivano, trasformandosi in macrofagi. Nel parenchima mammario e nel latte ritroviamo quindi i macrofagi i quali, avendo una complessità citoplasmatica elevata, per la presenza di molti granuli, vanno a confondersi nel morfologico alla popolazione di granulociti (Taylor et al., 1997). Infine troveremo i linfociti, scarsi di complessità interna (poco citoplasma con nucleo tondeggianti) e di medio-piccole dimensioni, a metà dell'ascissa nella parte più bassa del piano cartesiano (Figura 3.5).

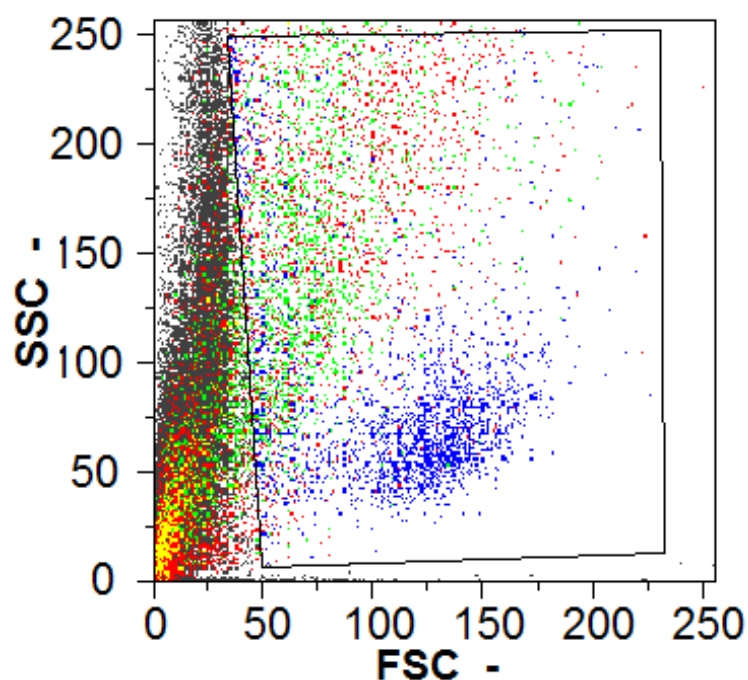


Figura 3.5. Grafico dot-plot rappresenta le popolazioni leucocitarie CD11+, CD14+ e CD44+ in un nostro campione. In rosso la popolazione CD11+ che rappresenta i polimorfonucleati. In verde la popolazione CD14+/CD11+ dei macrofagi. In blu i linfociti, popolazione CD11- e CD14-. Gli eventi non compresi nell'insieme R1 rappresentano il detrito cellulare.

Altri grafici usati rappresentavano la percentuale di positività di una data popolazione leucocitaria, presente all'interno del "gate" R₁, agli anticorpi marcatori; abbiamo quindi impostato sull'asse x le fluorescenze desiderate (FL₁, FL₂, FL₄, FL₅). Il canale di fluorescenza da leggere è stato impostato in base alla lunghezza d'onda d'eccitazione del marcatore che si deve andare a legare sulla popolazione cellulare d'interesse, come mostrato nella Tabella 3.8. Gli anticorpi marcatori usati in contemporanea erano stati abbinati in modo che le lunghezze d'onda d'eccitazione si sovrapponevano il meno possibile le une alle altre, confondendo così le popolazioni cellulari. La grandezza impostata sull'asse delle y è sempre la SCC. In particolare, con questo tipo di grafico, si è studiata la percentuale di positività al CD44 in FL₅ come mostrato nella figura (Figura 3.6). La stessa tipologia di grafico è stata usata per studiare la popolazione dei linfociti B (CD21 in FL₂).

Anticorpo contro	Fluoroforo	Λ massima d'eccitazione	Λ massima d'emissione	Canale di fluorescenza
CD11b	FITC	494 nm	518 nm	FL ₁
CD14	PE	496 nm	578 nm	FL ₂
CD44	APC	650 nm	660 nm	FL ₅
CD44	APC	650 nm	660 nm	FL ₅
CD21	PE	496 nm	578 nm	FL ₂
CD4	PE	496 nm	578 nm	FL ₂
CD8	Alexa Fluor 647	650 nm	668 nm	FL ₅

Tabella 3.8 Anticorpi, fluorofori e loro lunghezze d'onda (Λ). I colori indicano quali anticorpi sono stati utilizzati in contemporanea nei tubi da citofluorimetria.

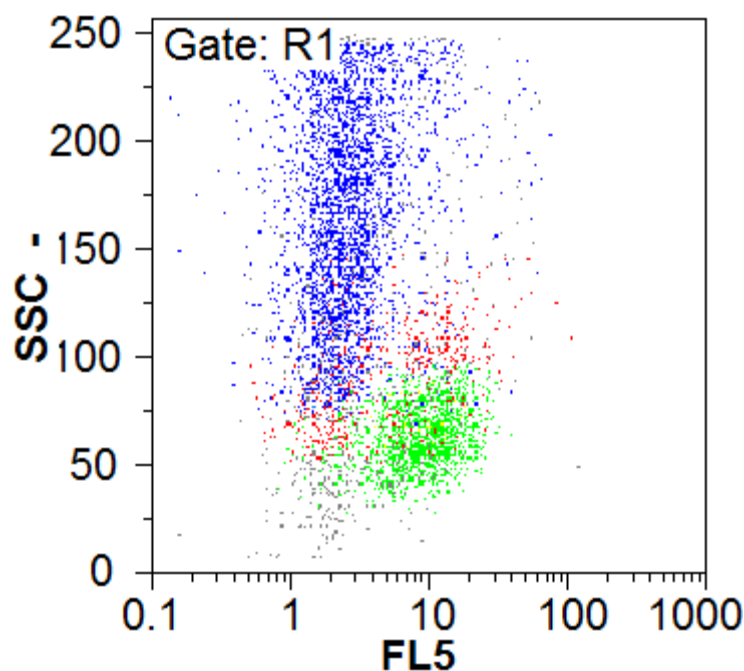


Figura 3.6. In questo grafico sono visualizzati tutti gli eventi positivi a CD44, marcatore panleucocitario, i quali rappresentano l'intera popolazione leucocitaria all'interno del *gate* R1. La suddivisione della popolazione leucocitaria in tre colori mostra la distribuzione dei granulociti (blu), macrofagi (rosso) e linfociti (verde) all'interno della popolazione CD44+.

L'ultimo modello di grafico di cui ci siamo avvalsi è stato impostato con una fluorescenza per l'ordinata ed un'altra per l'ascissa, tale grafico è stato sottoposto ad un processo di compensazione, precedentemente citato nel Capitolo 1.3.1. Le popolazioni leucocitarie per le quali ci siamo avvalsi della compensazione al fine di

studiarle sono le seguenti: CD11+/CD14+ e CD4+/CD8 (Immagine 3.7). I dati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica sono espressi in percentuale rispetto all'insieme R_1 di studio, ovvero la percentuale di una data sottopopolazione leucocitaria rispetto al totale dei leucociti presenti nel campione.

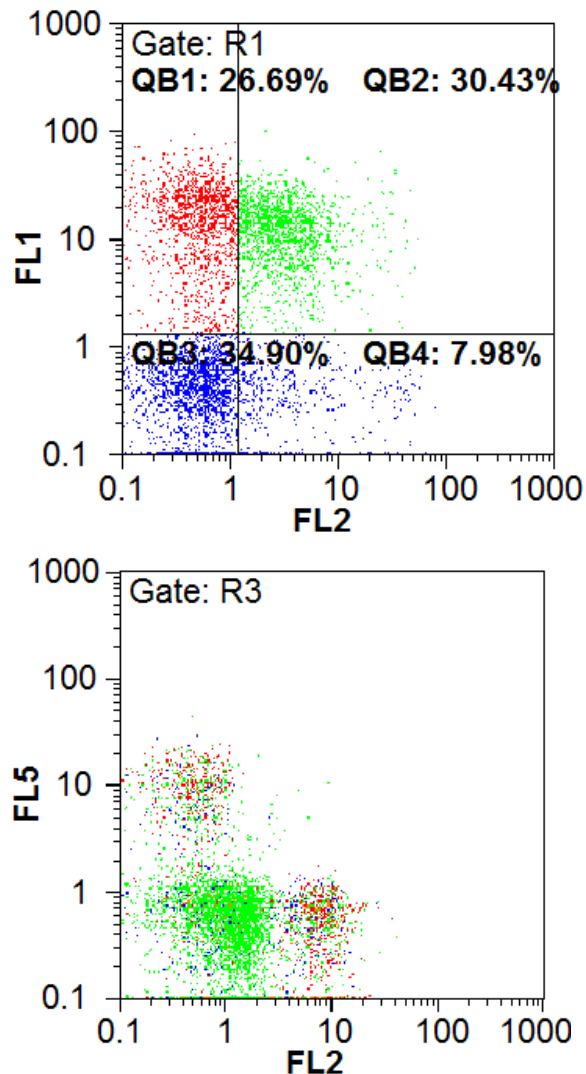


Figura 3.7. Il grafico FL1/FL2 evidenzia gli eventi CD11+/CD14-, ovvero i neutrofili (rosso), e gli eventi CD11+/CD14+, ovvero i macrofagi (verde). Il secondo grafico rappresenta gli eventi CD8+ in FL5 (linfociti T citotossici) ed eventi CD4+ in FL2 (linfociti T helper) dopo un processo di compensazione, entrambi evidenziati dal colore rosso.

A titolo conoscitivo proponiamo lo studio di un nostro campione per quanto riguarda i marcatori CD11/CD14/CD44 (Figura 3.8) e CD4/CD8 (Figura 3.9)

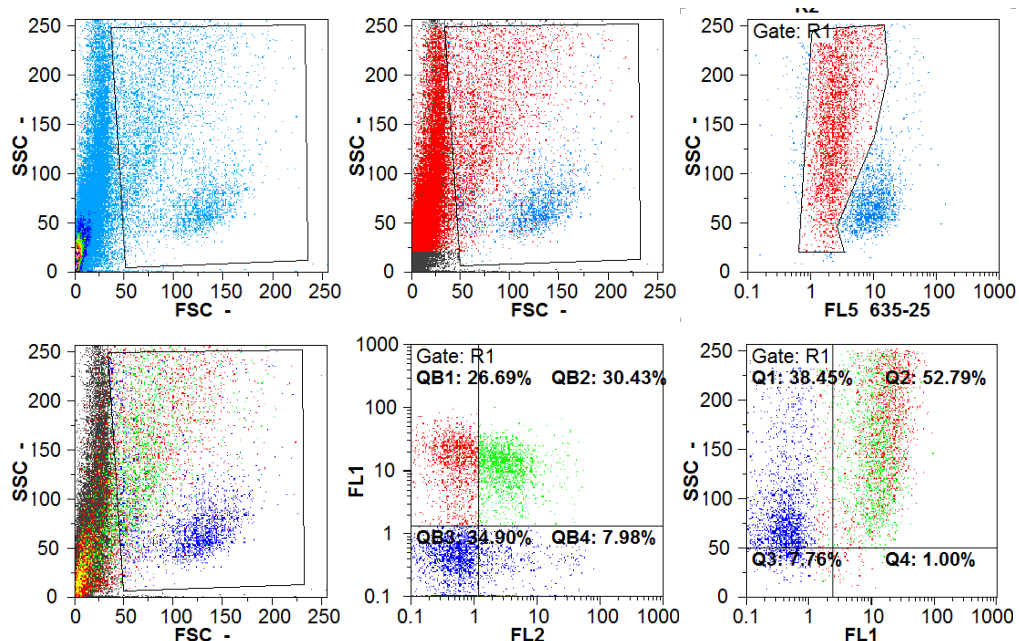


Figura 3.8. Studio delle popolazioni di macrofagi e granulociti neutrofili. Nel primo grafico in alto a sinistra è stato selezionato l'insieme R1, questo insieme è poi stato suddiviso in una popolazione di macrofagi/granulociti neutrofili che esprime CD11 e/o CD14 (rosso) ed una di linfociti che non lo esprime (blu) (morfologico in alto al centro). L'ultimo grafico in alto a destra mostra la popolazione CD44+, escludendo gli eventi presenti al di fuori di R1, che rappresentano il detrito cellulare del campione. Il grafico in basso a sinistra mostra la distribuzione di linfociti (eventi blu), macrofagi (eventi verdi) e granulociti neutrofili (eventi rossi) all'interno di R1. Nel citogramma in basso al centro sono rappresentati con in rosso i neutrofili ed in verde i macrofagi. L'ultimo grafico in basso a destra rappresenta la distribuzione degli eventi CD11+ (eventi rossi e verdi) presenti all'interno dell'insieme QB1 e QB2 del grafico che lo precede.

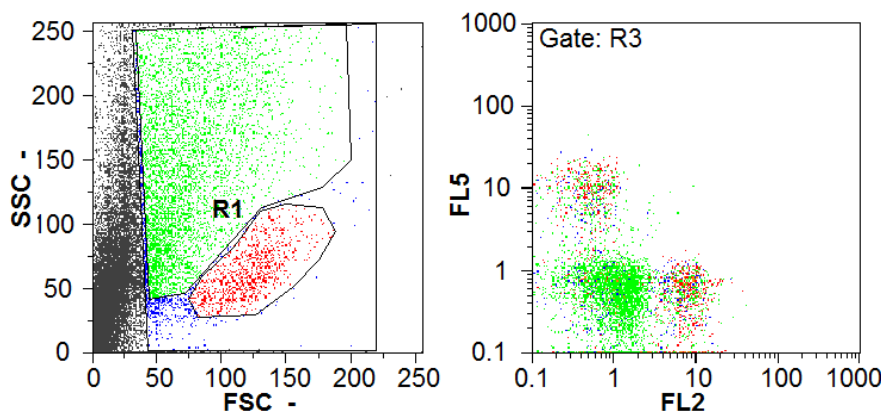


Figura 3.9. Studio delle popolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+. I linfociti T sono evidenziati dal colore rosso in entrambi i grafici. Il primo è un morfologico in cui viene evidenziata la popolazione totale di linfociti (T e B). Il secondo grafico rappresenta la positività a CD4 e CD8 sulla popolazione di linfociti evidenziata nel primo grafico. Gli eventi che esprimono di più in FL2 sono CD4+, mentre quelli che esprimono di più in FL5 sono CD8+.

3.4.2 Analisi statistica

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il programma SPSS 22.0. I risultati relativi alle percentuali delle differenti popolazioni leucocitarie e alle concentrazioni di proteine totali, AOPP e carbonili totali nel sono stati sottoposti al test di normalità di Kolmogorov-Smirnov. Le variabili che non si distribuivano normalmente sono stati trasformate nel loro logaritmo a base 10 (Log). Le medie e le deviazioni standard sono poi state riconvertite nei rispettivi valori di percentuale o concentrazione prima di essere rappresentate nei grafici e nelle tabelle della presente tesi. I risultati delle variabili relative alla distribuzione percentuale delle popolazioni leucocitaria (CD4+, CD8+, CD21+, CD44+, CD11+ e CD14+) e degli indicatori dell'ossidazione proteica (proteine totali, AOPP e CT) sono stati inizialmente classificati in tre gruppi sulla base della SCC del latte [SCC basso ($SCC \leq 100.000$ cc/ml); b) SCC intermedio ($100.000 < SCC \leq 400.000$ cc/ml); c) SCC elevato ($SCC > 400.000$ cc/ml)] e sottoposti ad analisi della varianza ad una via (*one way ANOVA*).

Successivamente, al fine di studiare l'associazione tra le variabili delle popolazioni leucocitarie tra loro e con i marcatori dell'ossidazione proteica, sono state eseguite delle analisi della varianza ad una via, utilizzando i criteri di classificazione riportati nella tabella 3.8.

Criterio di Classificazione	Gruppo "Basso"	Gruppo "Intermedio"	Gruppo "Elevato"
CD4+	$\% \leq 2,5$	$2,5 < \% \leq 4,7$	$\% > 4,7$
CD8+	$\% \leq 2,1$	$2,1 < \% \leq 5,6$	$\% > 5,6$
CD11+	$\% \leq 7,5$	$7,5 < \% \leq 30,4$	$\% > 30,4$
CD14+	$\% \leq 3,8$	$3,8 < \% \leq 6,5$	$\% > 6,5$
CD21+	$\% \leq 0,5$	$0,5 < \% \leq 0,9$	$\% > 0,9$
CD44+	$\% \leq 41,3$	$41,3 < \% \leq 90,6$	$\% > 90,6$

Tabella 3.9. Criteri di classificazione in base alle popolazioni leucocitarie. I gruppi, numericamente omogenei, sono stati definiti in base alla suddivisione in terzili ottenuta mediante la funzione "Frequencies" del software SPSS 24.0.

Poiché le concentrazioni di AOPP sono risultate associate sia alla percentuale di CD11+ che di CD44+, questa variabile è stata studiata anche mediante analisi della varianza a due vie (*two way ANOVA*), considerando come variabili indipendenti il raggruppamento in base alla percentuale di CD11+, di CD44+ e la loro combinazione.

Infine, la distribuzione dei soggetti positivi alle differenti popolazioni cellulari è stata esplorata mediante la funzione “Crosstabs” (tabelle di contingenza) e il test del χ^2 del programma SPSS 24.0.

I risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando $P < 0,05$ e tendenzialmente significativi quando $P < 0,1$. Quando l'analisi della varianza è risultata significativa, il confronto tra le medie dei gruppi è stato eseguito mediante il test di Duncan.

4 RISULTATI

4.1 Studio DCC/SCC

I campioni presi in esame in questo studio sono stati ottenuti da 47 bovine, appartenenti alla razza Frisona, Pezzata Rossa e Bruna, di fascia d'età e periodo di lattazione casuali. In primis sono stati analizzati i valori percentuali medi delle popolazioni leucocitarie in funzione dei tre raggruppamenti sulla base della SCC, lo stesso è stato fatto per le AOPP, carbonili e proteine totali (Tabella 4.1).

Criterio di classificazione dei gruppi												
Numerosità delle SCC nel campione		N°	PT280 (mg/ml)	CT (nmol/mg proteine)	AOPP (nmol/ml)	Popolazione CD4+ (%)	Popolazione CD8+ (%)	Popolazione CD4/CD8	Popolazione CD44 (%)	Popolazione CD21 (%)	Popolazione CD11 (%)	Popolazione CD14 (%)
Gruppo 1	Media ± s.e.m.	19	1,7895 ±0,09760	0,5526 ±0,08214	145,2947 ±17,10376	5,5944 ±1,09041	7,1778 ±1,71065	1,3434 ±0,27072	64,9388 ±7,45934	0,9833 ±0,19102	9,7839 ±2,21993	4,9983 ±1,17327
Gruppo 2	Media ± s.e.m.	13	1,8692 ±0,13652	0,5308 ±0,04583	132,4308 ±20,35374	2,6692 ±0,38320	2,9846 ±0,56499	1,2250 ±0,28301	58,6000 ±9,81130	0,6846 ±0,13294	28,9692 ±7,67935	5,4923 ±1,31512
Gruppo 3	Media ± s.e.m.	15	2,4800 ±0,37508	0,6867 ±0,11164	154,2600 ±16,26876	5,3333 ±1,32013	5,0400 ±1,13762	1,2193 ±0,18584	58,3169 ±9,62681	0,6400 ±0,13158	43,0467 ±5,59465	7,6947 ±1,76681
Totale	Media ± s.e.m.	47	2,0319 ±0,13633	0,5894 ±0,05028	144,5979 ±10,16948	4,6826 ±0,63197	5,2957 ±0,80793	1,2694 ±0,14301	61,0205 ±4,99396	0,7870 ±0,09508	26,0524 ±3,57713	6,0172 ±0,82563

Tabella 4.1. Medie delle variabili all'interno dei gruppi di SCC. Il gruppo 1 è costituito da campioni con numerosità bassa delle cellule somatiche ($SCC \leq 100.000$ cc/ml). Il gruppo 2 è costituito da campioni con numerosità intermedia delle cellule somatiche ($100.000 < SCC \leq 400.000$ cc/ml). Il gruppo 3 è costituito da campioni con numerosità elevata delle cellule somatiche ($SCC > 400.000$ cc/ml). “N°”: numero di campioni compresi nel gruppo. “S.e.m.”: errore standard della media.

Le medie percentuali delle sottopopolazioni leucocitarie presenti in ciascuno dei tre gruppi di SCC, insieme all'errore standard, sono stati schematizzati nel seguente grafico ad istogrammi (Figura 4.1).

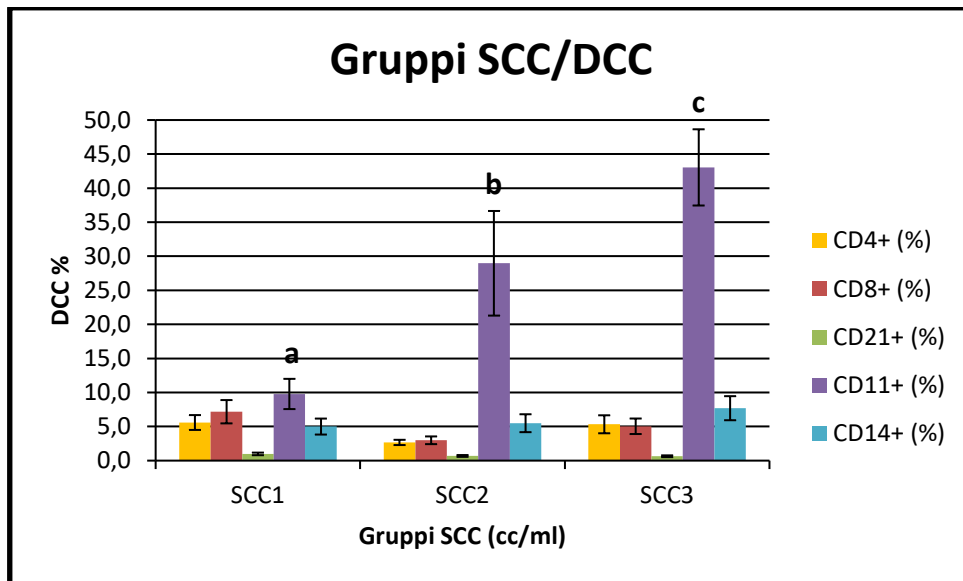


Figura 4.1. Relazioni tra le percentuali delle sottopopolazioni leucocitarie (Differential Cell Count, DCC) ed i tre gruppi di SCC. Per SCC1 si intende SCC bassa ($SCC \leq 100.000$ cc/ml). Per SCC2 si intende SCC intermedia ($100.000 < SCC \leq 400.000$ cc/ml). Per SCC3 si intende SCC elevata ($SCC > 400.000$ cc/ml). I CD4+, CD8+, CD21+, CD11+ e CD14 + rappresentano rispettivamente linfociti T helper, linfociti T citotossici, linfociti B, granulociti neutrofili e macrofagi. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti. Dove $a < b < c$.

Come si può notare, vi è una relazione significativa tra l'aumento delle cellule somatiche e l'aumento dei granulociti neutrofili (CD11) (ANOVA: $F=14,860$ con $P<0,001$) tra gruppi= $14,860$ con $P<0,001$. È possibile osservare anche un aumento dei macrofagi in relazione all'aumento della SCC, sebbene questa relazione non sia stata statisticamente significativa ($F=1,924$; $P=0,159$) (Figura 4.2).

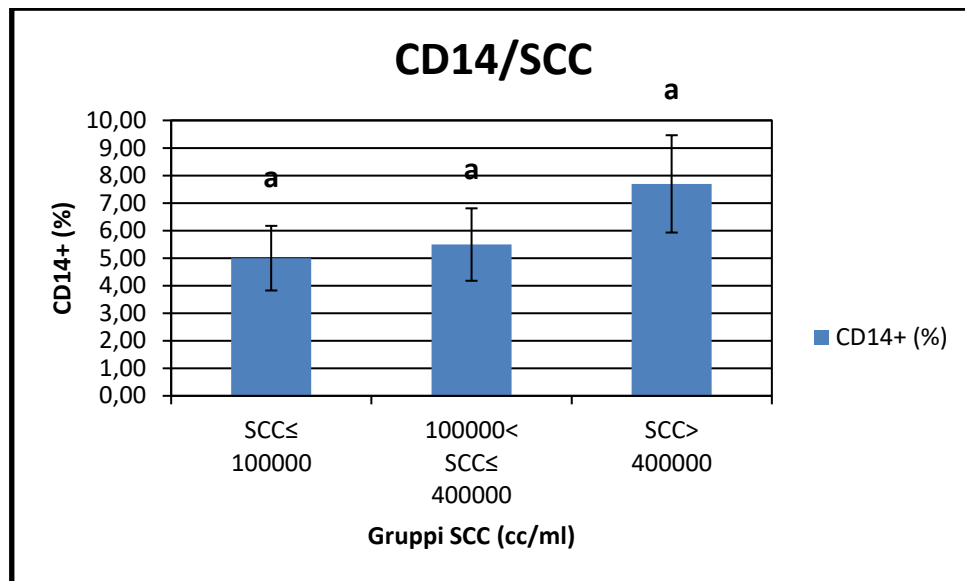


Figura 4.2. Relazione tra la percentuale delle cellule CD14+ (media $\pm$ s.e.m.) ed i tre gruppi di SCC. I limiti di cellule somatiche per ciascun gruppo di SCC sono i medesimi della Figura 4.1. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti.

Tutte le altre medie percentuali delle sottopopolazioni leucocitarie, eccetto le popolazioni CD8+ e CD4+, hanno rivelato relazioni non statisticamente significative rispetto alla conta delle cellule somatiche.

4.2 Relazione tra AOPP e SCC

Non è stata osservata alcuna relazione statisticamente significativa tra le concentrazioni di AOPP e la SCC ($F=0,611$; $P=0,548$) (Figura 4.3).

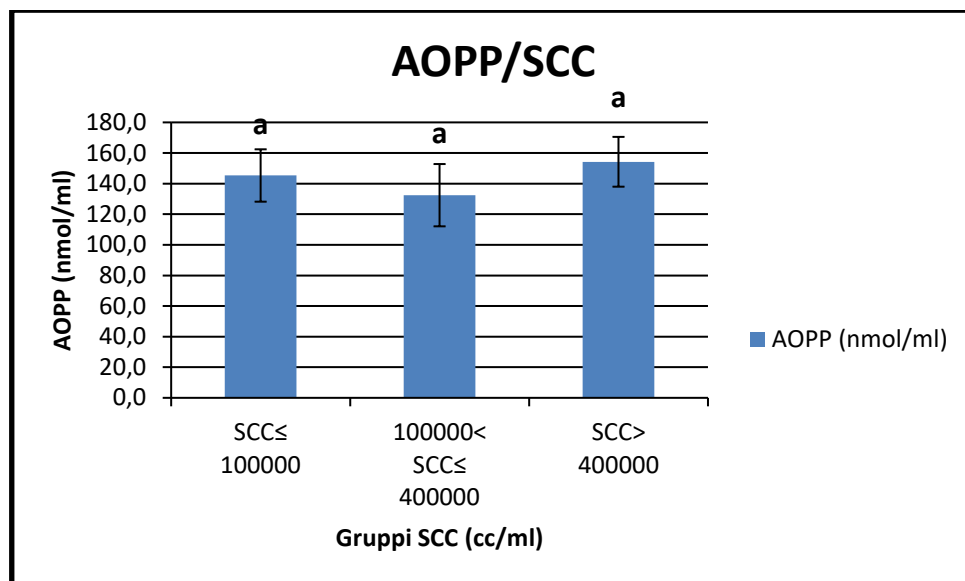


Figura 4.3. Variazione delle concentrazioni di AOPP nel siero di latte (media $\pm$ s.e.m.) in relazione al contenuto di SCC nel campione di latte. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti.

4.3 Relazioni tra sottopopolazioni leucocitarie ed AOPP

Le concentrazioni di AOPP nel siero di latte hanno mostrato un aumento statisticamente significativo all'aumentare dei CD44+ ($F=10,617$; $P<0,001$) e dei CD11+ ($F = 8,206$; $P<0,001$) (Figure 4.4 e 4.5).

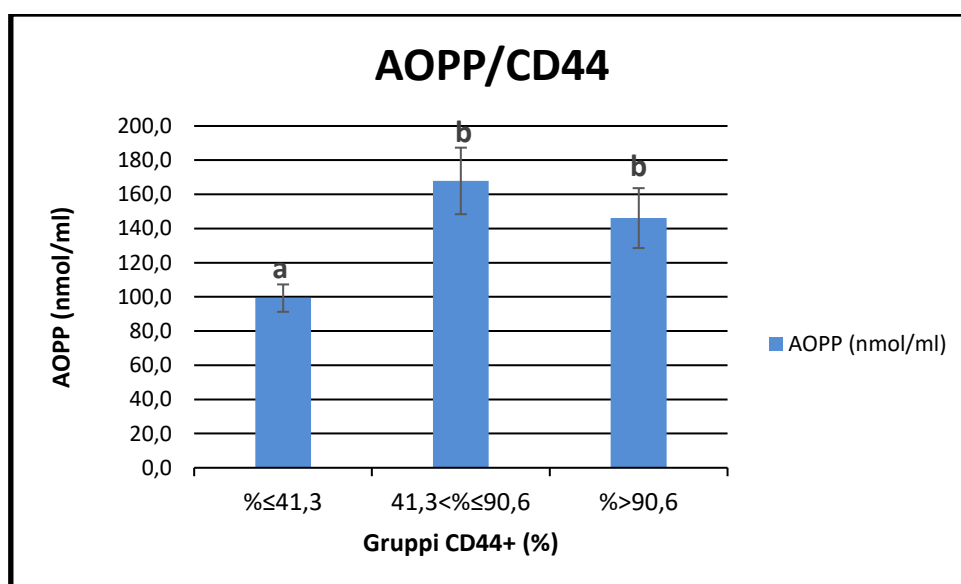


Figura 4.4. Variazione delle concentrazioni di AOPP nel siero di latte (media $\pm$ s.e.m.) in relazione alla percentuale di CD44+ nel campione di latte. Lettere diverse (a, b) sopra le barre indicano differenze statisticamente significative ($P<0,05$; Test di Duncan). Con a < b.

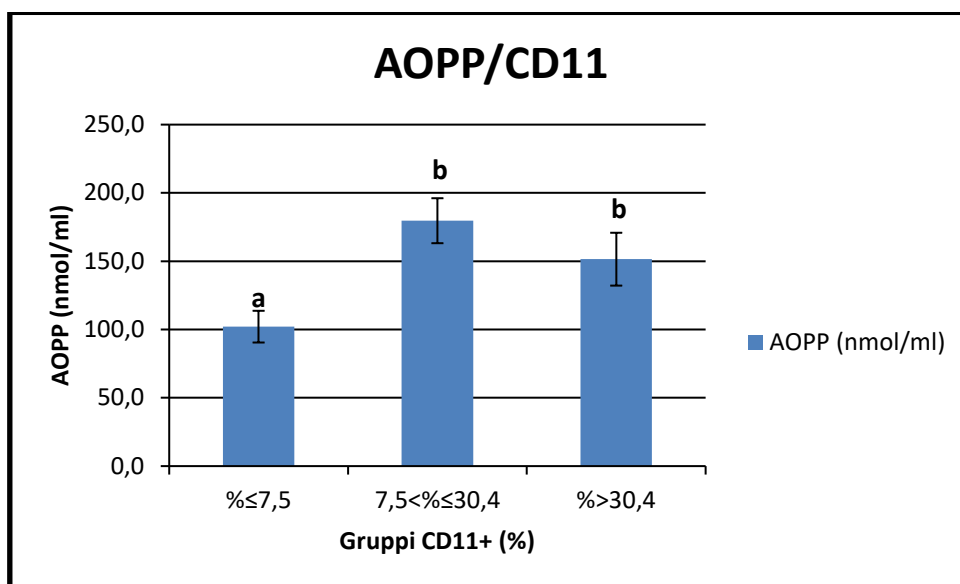


Figura 4.5. Variazione delle concentrazioni di AOPP nel siero di latte (media $\pm$ s.e.m.) in relazione alla percentuale di CD11+ nel campione di latte. Lettere diverse (a, b) sopra le barre indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$; Test di Duncan). Con $a < b$.

Poiché le concentrazioni di AOPP nel siero di latte aumentavano sia in relazione alla percentuale di CD11+ che di CD44+, si è scelto di esaminare queste relazioni con una analisi della varianza a due vie (vedere paragrafo 3.4.2), utilizzando una procedura GLM (General Linear Model) del pacchetto statistico SPSS 24.0. Questo approccio ha confermato le relazioni altamente significative tra la concentrazione di AOPP nel siero di latte e le percentuali di CD11+ e CD44+ osservate mediante analisi della varianza ad una via (CD11+: $F=12,167$; $P < 0,001$; CD44+: $F=10,617$; $P < 0,001$). Inoltre, è stato osservato un effetto significativo per la combinazione delle due variabili (CD11*CD44: $F=2,742$; $P < 0,05$) (Figura 4.6).

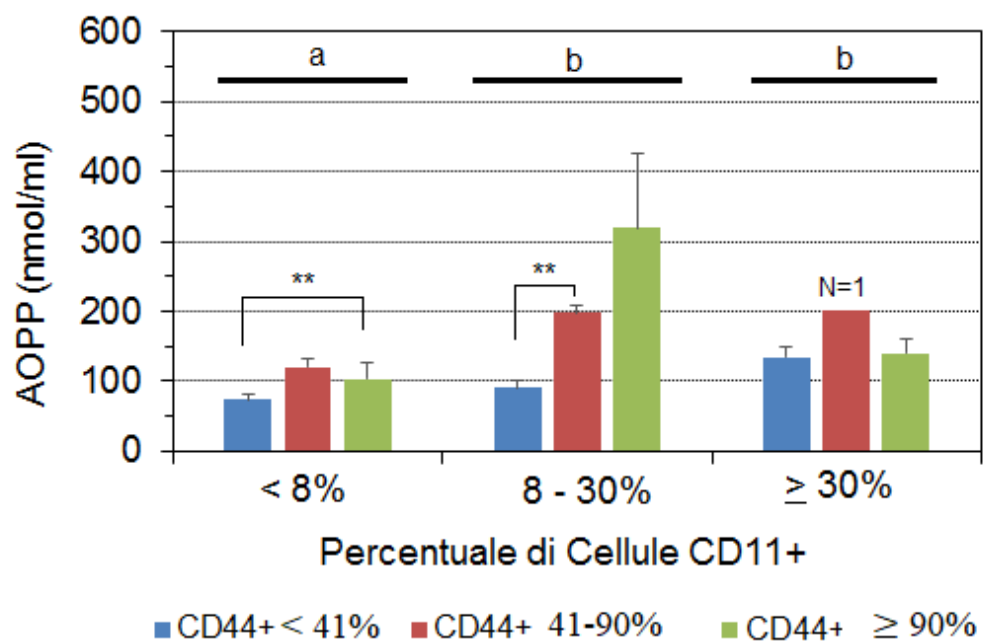


Figura 4.6. Variazione delle concentrazioni di AOPP nel siero di latte (media $\pm$ s.e.m.) in relazione alla percentuale di CD11+ e CD44+ nel campione di latte. Lettere diverse (a, b) sopra le barre indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$; test LSD), gli asterischi (**) indicano differenze statisticamente significative entro i gruppi di CD44+ (** $P < 0,01$; test LSD). Con $a < b$.

4.4 Relazioni tra sottopopolazioni leucocitarie

Dalle analisi statistiche sono inoltre emerse relazioni tra le varie sottopopolazioni leucocitarie nei tre gruppi di SCC (Figura 4.7). Della relazione tra CD11+ e CD14+ con la SCC abbiamo già discusso precedentemente (Paragrafo 4.1).

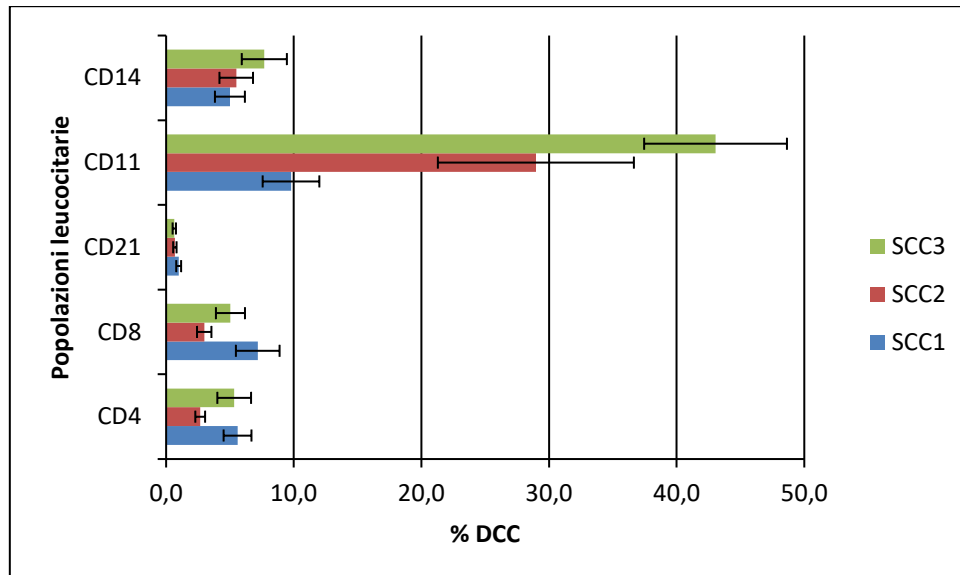


Figura 4.7. Rapporto tra gruppi di SCC e sottopopolazioni leucocitarie. Le percentuali di sottopopolazioni (% DCC) sono visualizzate in funzione dei tre gruppi di SCC. Per SCC1 si intende SCC basso ($SCC \leq 100.000$ cc/ml). Per SCC2 si intende SCC intermedio ($100.000 < SCC \leq 400.000$ cc/ml). Per SCC3 si intende SCC elevato ($SCC > 400.000$ cc/ml).

Dall'analisi della varianza tra gruppi per il valore SCC risulta un $F=2,677$ con $P<0,1$ per CD4+ ed un $F=2,633$ con $P<0,1$ per CD8+. Da ciò si deduce che tale relazione è tendenzialmente significativa (Figure 4.7,4.8 e 4.9).

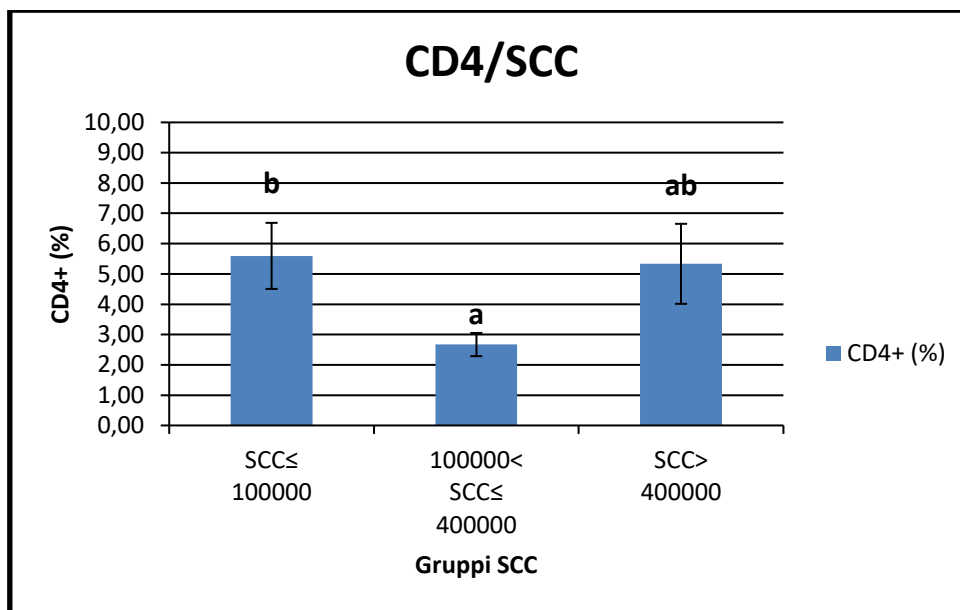


Figura 4.8. Variazione della percentuale delle cellule CD4+ (media $\pm$ s.e.m.) in relazione alla SCC del latte. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti. Con $a < b$.

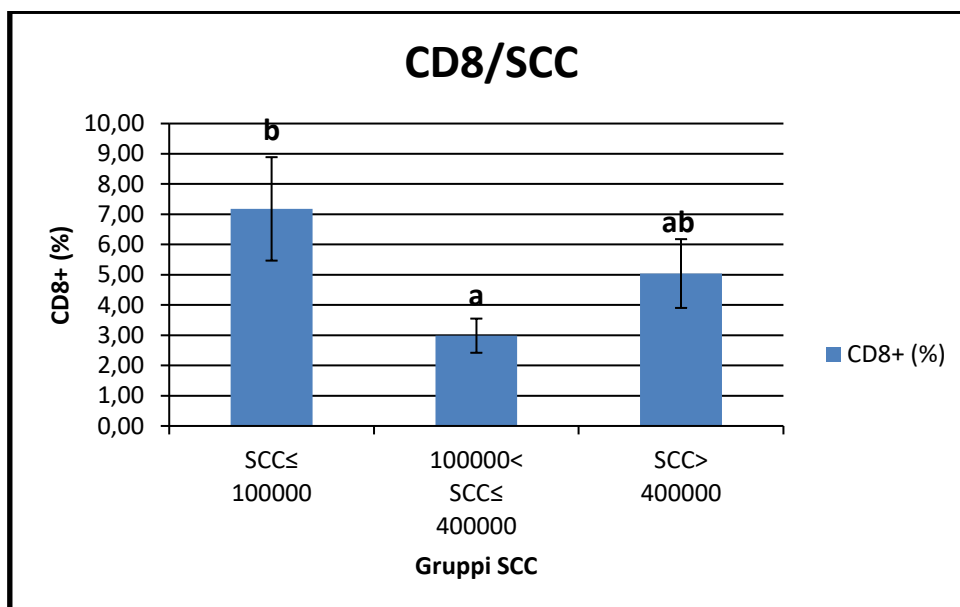


Figura 4.9. Variazione della percentuale delle cellule CD8+ (media $\pm$ s.e.m.) in relazione alla SCC del latte. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti. Con $a < b$.

Diversa è la relazione tra gruppi di CD4+ e CD8+ che risultano correlati in modo statisticamente significativo; relazione statisticamente significativa delle medie percentuali della popolazione CD4+ all'interno dei gruppi CD8+ ($F=7,434$; $P<0,05$) e delle medie CD8+ all'interno dei gruppi CD4+ ($F=12,945$; $P<0,001$). Inoltre il test di Duncan rileva differenze statisticamente significative. Le relazioni

precedentemente osservate possono essere visualizzate nei due grafici sottostanti (Figure 4.10 e 4.11)

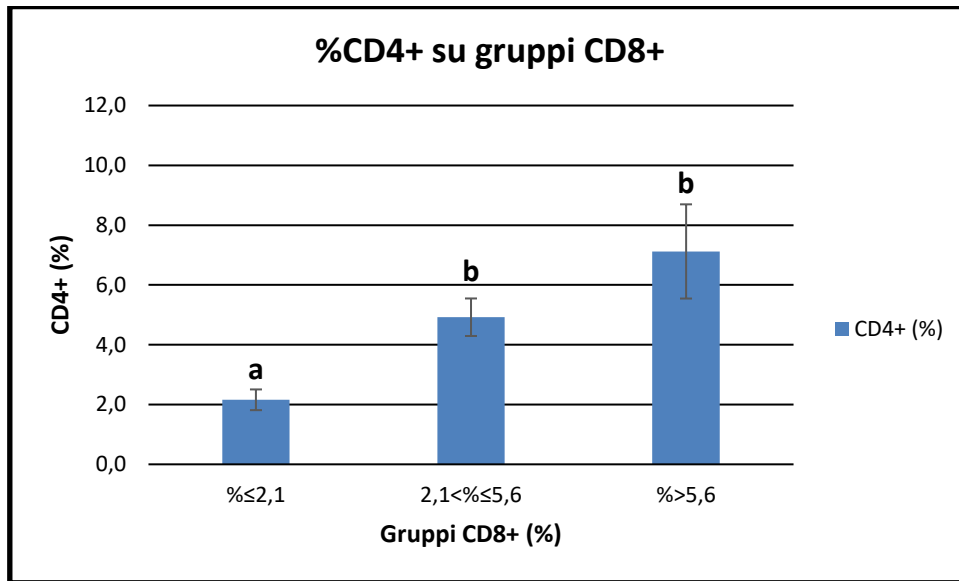


Figura 4.10. Variazione delle percentuali di CD4+ (media $\pm$ s.e.m.) in relazione ai gruppi CD8+. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti. Con $a < b$. Si può notare che le popolazioni di CD4+ e CD8+ hanno una correlazione positiva.

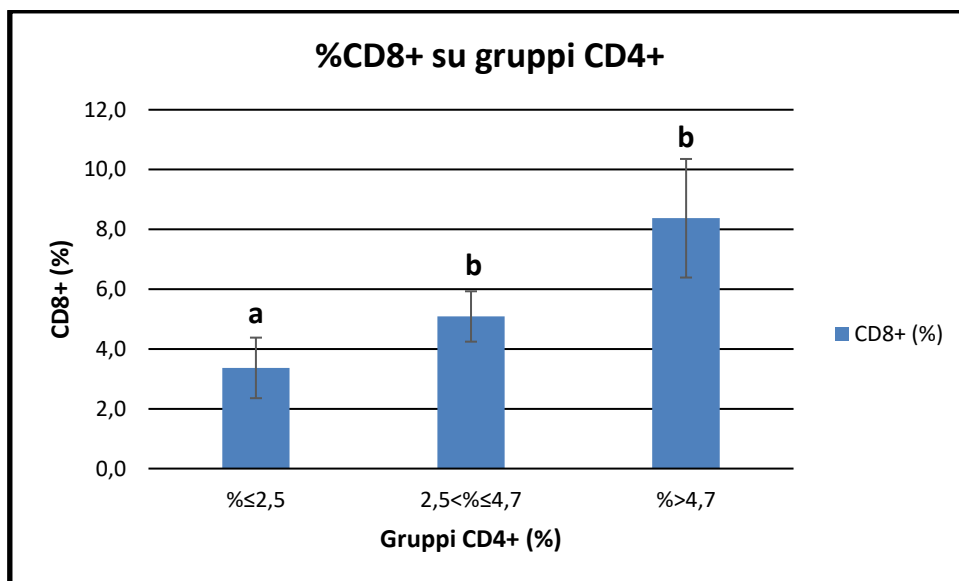


Figura 4.11. Variazione delle percentuali di CD8+ (media $\pm$ s.e.m.) in relazione ai gruppi CD4+. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti. Con $a < b$. Si può notare che le popolazioni di CD4+ e CD8+ hanno una correlazione positiva.

Per quanto riguarda i valori assunti dal rapporto tra CD4+ e CD8+ (CD4+/CD8+) nei gruppi suddivisi per quantità di cellule somatiche non sono state evidenziate

relazioni statisticamente significative ($F=0,082$; $P=0,922$). Il test di Duncan non rivela differenze statisticamente significative tra i gruppi per SCC (Figura 4.12).

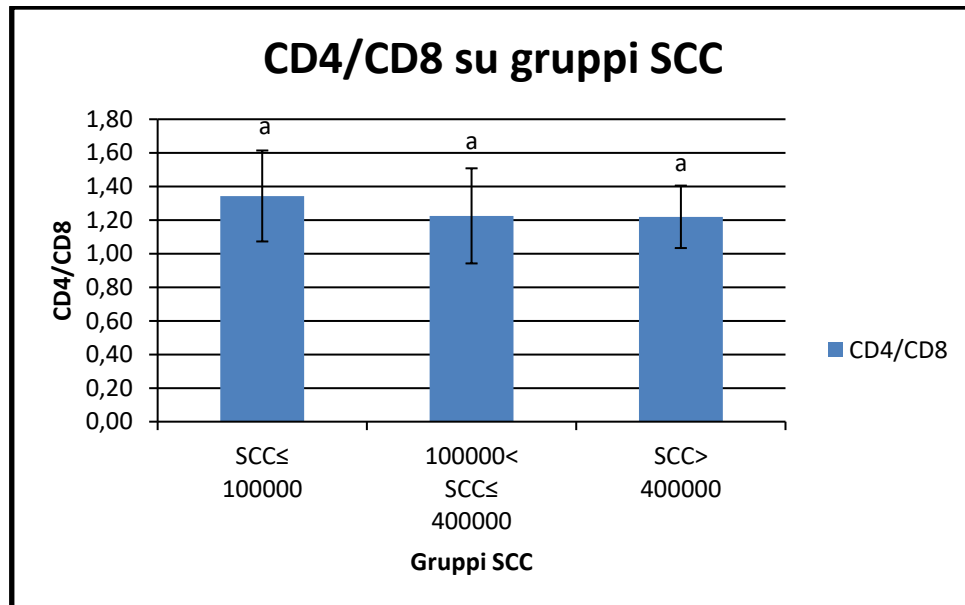


Figura 4.12. Variazione del rapporto Cd4+/CD8+ (media ± s.e.m.) in relazione ai gruppi SCC. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti. Con $a < b$.

Altre relazioni meno importanti ai fini dello studio, ma comunque statisticamente significative sono quelle tra:

- CD11+ e CD21+: $F=5,758$ con $P<0,01$ (Figura 4.13)
- CD21+ e CD8+: $F=4,859$ con $P<0,05$ (Figura 4.14)
- CD21+ e CD4+: $F=4,797$ con $P<0,05$ (Figura 4.15)
- CD14+ e CD11+: $F=8,311$ con $P=0,001$ (Figura 4.16).

Per quanto riguarda i carbonili e le proteine totali non sono state trovate relazioni statisticamente significative con le altre variabili.

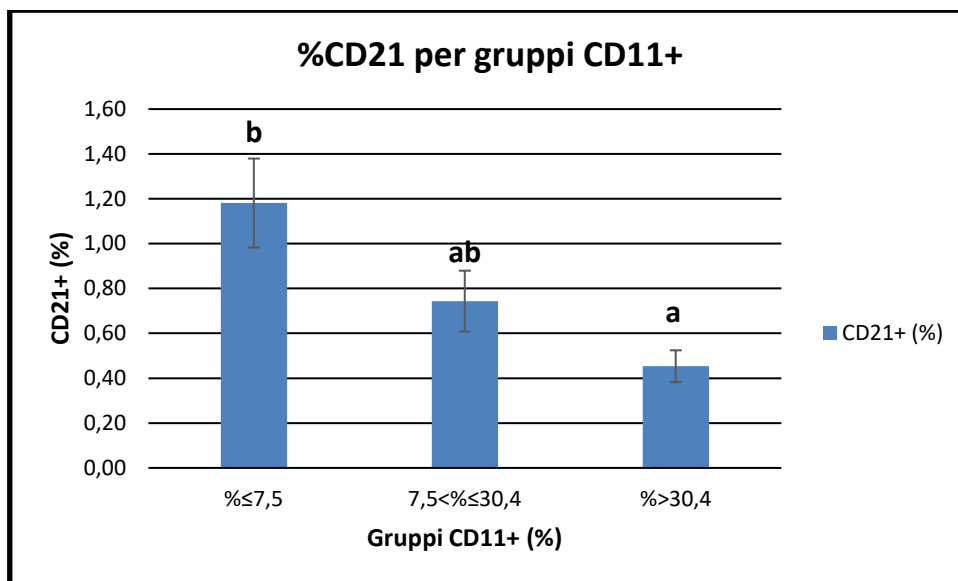


Figura 4.13. Variazione della percentuale delle cellule CD21+ (media $\pm$ s.e.m.) in relazione ai gruppi CD11+. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti. Con $a < b$ e $a \sim ab \sim b$.

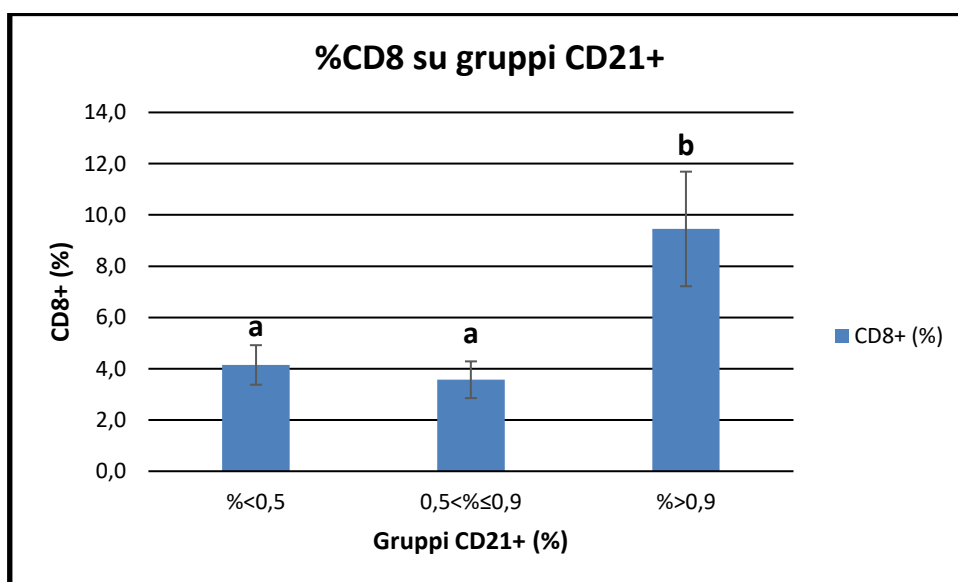


Figura 4.14. Variazione della percentuale delle cellule CD8+ (media $\pm$ s.e.m.) in relazione ai gruppi CD21+. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti. Con $a < b$.

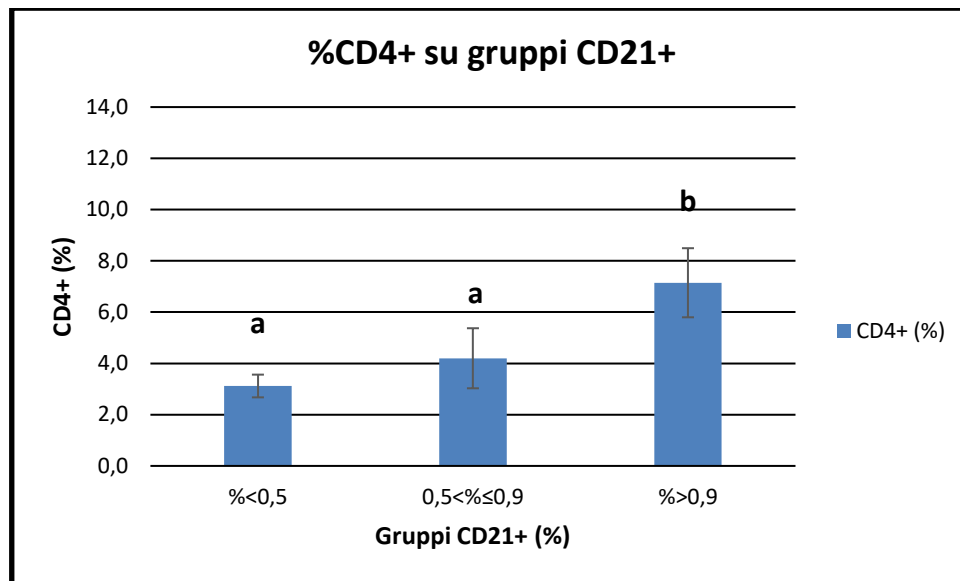


Figura 4.15. Variazione della percentuale delle cellule CD4+ (media $\pm$ s.e.m.) in relazione ai gruppi CD21+. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti. Con $a < b$.

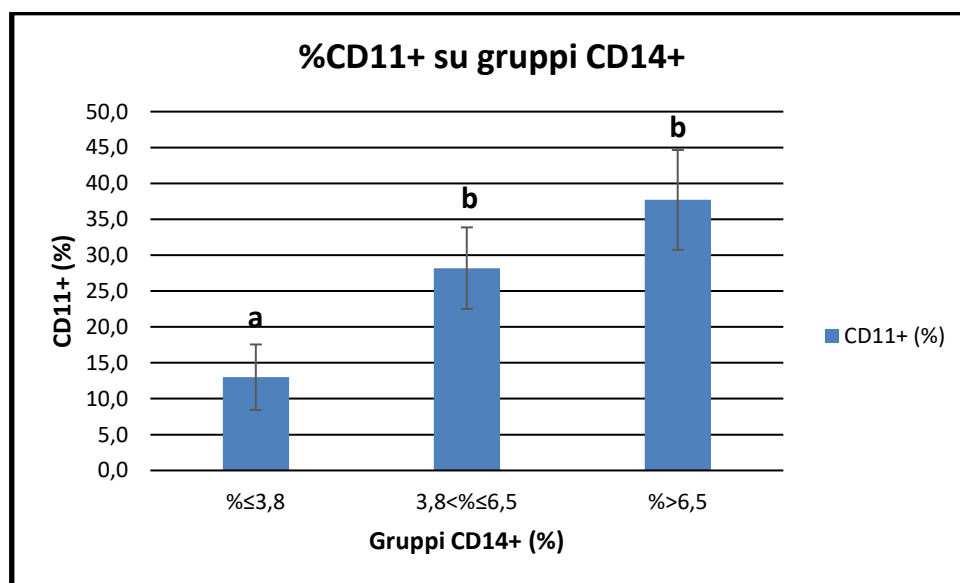


Figura 4.16. Variazione della percentuale delle cellule CD11+ (media $\pm$ s.e.m.) in relazione ai gruppi CD14+. A lettere uguali, corrispondono medie non significativamente differenti, a lettere diverse, corrispondono medie significativamente differenti. Con $a < b$.

5. DISCUSSIONE

Questo progetto di tesi si pone in continuità con tre studi che lo hanno preceduto. Uno di questi lavori ha rinvenuto delle deboli ma significative correlazioni tra il numero di cellule somatiche nel latte e le concentrazioni di AOPP (Guzzo et al., 2015), mentre un altro studio riporta rilevanti correlazioni tra l'aumento delle AOPP e dei carbonili a seguito del trattamento di campioni di siero di latte con HOCl (radicale principalmente prodotto dalla MPO dei granulociti neutrofili) (Gabai et al., 2014). Un terzo lavoro ha indagato la produzione di AOPP nel plasma bovino da parte dei granulociti neutrofili e HOCl, ritrovando correlazioni positive tra produzione di AOPP ed esposizione del siero ai granulociti neutrofili e all'HOCl (Bordignon et al., 2014).

Il presente studio si era posto quindi l'obiettivo di rinvenire eventuali interrelazioni tra le SCC, specifiche sottopopolazioni leucocitarie (con particolare attenzione per i granulociti neutrofili) ed i marcatori di ossidazione proteica (AOPP e carbonili) nel latte bovino. In questo caso sono state viste relazioni statisticamente significative tra le concentrazioni di AOPP e l'espressione degli Ag leucocitari CD11 (Ag espresso dai granulociti neutrofili) e CD44 (Ag panleucocitario). Le AOPP sembrano essere positivamente correlate all'aumento delle percentuali di granulociti neutrofili e delle cellule leucocitarie in generale. In particolare, si nota che i gruppi con percentuali intermedie ed elevate di cellule CD11+ ($7,5 < \% \leq 30,4$ e $\% > 30,4$) hanno valori di AOPP significativamente più elevati del gruppo con percentuale bassa di cellule CD11+ ($\% \leq 7,5$). In contemporanea i gruppi con percentuali basse di cellule CD44+ ($\% \leq 41$) mostrano valori di AOPP significativamente inferiori ai gruppi con percentuali di cellule CD44+ intermedie ed alte ($41 < \% \leq 90$ e $\% > 90$), vedi Figura 4.6. Inoltre, il gruppo con percentuale intermedia di cellule CD11+ non ha valori di AOPP significativamente inferiori rispetto al gruppo con percentuale elevata. Questo comportamento può essere spiegato dall'evidenza, riscontrata in un altro studio, dell'inibizione dei granulociti neutrofili incubati con concentrazioni di AOPP pari a $4,2 \pm 2,1$ nmol/mg di proteine (Bordignon et al., 2014). Si ricorda che il CD44 oltre ad essere un Ag panleucocitario è una glicoproteina transmembrana sovraespressa dai granulociti neutrofili soprattutto in fase di migrazione dal sangue alla mammella; in altre parole i granulociti neutrofili attivati presenti nei quarti dove c'è un fenomeno mastitico esprimono in percentuali superiori la glicoproteina CD44

(Gonen et al., 2008). La nostra ipotesi è che un abbondante popolazione di neutrofili attivati risulterebbe quindi essere inibita dall'attività dei suoi stessi prodotti dell'ossidazione proteica e, paradossalmente, ciò porterebbe ad avere concentrazioni simili di AOPP nel latte sia di bovine con un grado di infiammazione intermedio (% di cellule CD11+ e CD44+ intermedie) che in bovine con un severo quadro infiammatorio (% di cellule CD11+ e CD44+ alte). Per quanto riguarda i carbonili totali, essi non sono risultati statisticamente correlati al numero di granulociti neutrofili, questa evidenza viene supportata da precedenti studi in quanto essi sono risultati essere marcatori poco specifici d'infiammazione poiché vengono generati da una moltitudine di processi ossidativi all'interno dell'organismo (Winterbourn, 2002; Dean et al., 1997).

Non sono inoltre risultate relazioni statisticamente significative tra concentrazione di AOPP nel latte e la conta delle cellule somatiche, ciò fa dedurre che è poco influente, se non ininfluente, il numero di cellule somatiche nella genesi dell'ossidazione proteica durante la mastite, rispetto all'elevata quantità di neutrofili (Figura 4.3).

Differentemente dai precedenti studi sul bovino, il nostro si avvaleva in contemporanea della conta delle cellule somatiche, come metodo di controllo per le mastiti, e della citofluorimetria, per individuare quale fosse la sottopopolazione leucocitaria che in vivo fosse responsabile dell'aumento delle AOPP durante questi quadri infiammatori. Un punto debole del nostro lavoro è stato di non aver preso campioni seriali dagli stessi bovini in un arco temporale di qualche settimana di modo da avere un quadro delle variazioni di AOPP, carbonili totali, SCC e popolazioni leucocitarie nel tempo. Inoltre, per meglio distinguere i campioni provenienti da mammelle con mastite rispetto a mammelle sane sarebbe stato opportuno eseguire degli esami batteriologici da prelievi sterili. Ulteriormente, sarebbe risultato utile aumentare il numero di animali campionati per rafforzare la numerosità del gruppo contenente un numero intermedio di cellule somatiche (soprattutto campioni di latte tra le 200000 e le 400000 cellule somatiche). Tuttavia bisogna considerare come più attendibile la DCC per il rilevamento dei quadri mastitici rispetto alla SCC che varia a seconda del periodo di lattazione, stagione, temperatura oltre al tipo ed al numero di mungiture (Kelly, et al., 2000; Pilla et al., 2013).

In tale studio sono state anche prese in esame le relazioni tra le sottopopolazioni leucocitarie e la SCC. I granulociti neutrofili dimostrano essere correlati

positivamente alle cellule somatiche (Figura 4.1e 4.7), come per altro associato da studi citofluorimetrici precedenti (Kelly et al., 2000). I leucociti CD8⁺ (linfociti T citotossici) e CD4⁺ (linfociti T helper) nei tre gruppi suddivisi per cellule somatiche alte (SCC>400000 cc/ml), medie (100000 cc/ml<SCC≤400000) e basse (SCC<100000) hanno un andamento simile tra loro (Figura 4.8 e 4.9); si trovano in percentuali più elevate nei gruppi con SCC bassa e alta mentre diminuiscono significativamente nel gruppo con la SCC intermedia. Abbiamo anche riscontrato una relazione statisticamente significativa tra le percentuali assunte da CD8⁺ e CD4⁺ nella suddivisione per gruppi CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 4.10 e 4.11); in altre parole le due popolazioni di linfociti T sembrano essere positivamente correlate. Le precedenti evidenze riguardanti i linfociti T helper e citotossici ci fanno dedurre che le due popolazioni linfocitarie varino tra loro in percentuali simili al variare del contenuto di cellule somatiche del latte e quindi dello stato di salute/malattia della mammella. Un fattore che va a scapito del nostro studio è il fatto che un singolo campionamento rappresenta solo un momentaneo aspetto della mammella e non uno studio sul progredire della mastite. La variabilità dei CD4⁺ e CD8⁺ ed il loro rapporto nel latte bovino è stata approfonditamente studiata con l'ausilio della citofluorimetria da lavori precedenti non sempre concordi nei risultati ottenuti, ma concordi nell'affermare che vi è un'ampia variabilità legata al periodo di lattazione, allo stato di salute della mammella ed al tipo d'infiammazione ed agente eziologico della mastite (Mehrzhad et al., 2008; Schukken et al., 2011; Taylor et al., 1997; Yamaguchi et al., 1999; Yang, et al., 1997). Sono state indagate altre relazioni tra le sottopopolazioni leucocitarie, anche se secondarie ai fini dello studio. Statisticamente significative risultano le relazioni tra i linfociti B (CD21⁺) ed i granulociti neutrofili con una proporzionalità inversa (Figura 4.13). Ciò può essere dovuto al fatto che alte percentuali di neutrofili denotino uno stato infiammatorio acuto in cui i linfociti B non sono ancora arrivati oppure può derivare dal fatto che stati infiammatori avanzati rendano meno rilevabili al citofluorimetro la già esigua popolazione di linfociti B. Normalmente le cellule CD21⁺ tendono a rimanere basse nel numero e costanti per tutta la lattazione con un leggero aumento durante le fasi d'infiammazione cronica dove inducono la risposta anticorpale (Riollet et al., 2001). Infine percentuali di linfociti B appaiono positivamente correlate sia con l'aumento delle cellule CD4⁺, in accordo con precedenti studi (Mehrzhad et al., 2008), sia con l'aumento delle cellule CD8⁺ (Figure 4.14 e 4.15). Infine, anche le cellule CD11⁺ e CD14⁺ (cellule d'origine

macrofagica) dimostrano una correlazione positiva statisticamente significativa (Figura 4.16). Quest'ultima correlazione è legata al fatto che il quadro flogistico neutrofilico-macrofagico è generalmente comune.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, le AOPP del latte possono essere utilizzate come marcatori per quadri mastitici, tuttavia sono necessari ulteriori studi per verificare le variazioni dei prodotti dell'ossidazione al variare dello stadio infiammatorio.

Inoltre, è risultata una chiara correlazione positiva tra la concentrazione di cellule somatiche del latte e la percentuale di granulociti neutrofili. Le AOPP, per quanto riguarda i nostri risultati, non sono invece correlabili alla quantità di cellule somatiche del latte, diversamente da quanto visto in uno studio precedente (Guzzo et al., 2015). Le percentuali di linfociti T *helper* e citotossici, sembrano essere correlate positivamente e mostrano variazioni percentuali simili al variare del numero di cellule somatiche presenti.

I punti di forza sono:

- Il costo esiguo del test per le AOPP (1 € a piastra) unito al fatto che con una piastra da 96 pozzetti si riescano ad analizzare contemporaneamente, nell'arco di qualche ora, 40 campioni di latte con due pozzetti per ogni campione
- L'analisi delle AOPP non richiede, come invece succede per molti altri test, che il campione sia analizzato fresco, bensì può essere conservato ad una temperatura di -80 °C anche per un anno, senza tuttavia incidere significativamente sulla sensibilità e specificità del test
- Le AOPP potrebbero rappresentare un importante mezzo di diagnosi precoce per le mastiti, tuttavia debbono essere portati avanti ulteriori studi.

I punti deboli di questo studio sono:

- Non avere effettuato un esame batteriologico su prelievo sterile di latte per distinguere con maggiore sicurezza i capi con mastite da quelli sani, soprattutto nel gruppo con numerosità intermedia delle cellule somatiche,
- L'esiguo campione studiato particolarmente nel gruppo a cellularità intermedia dove, probabilmente, vi sono il maggior numero di casi di mastiti subcliniche.

Alla luce dei risultati ottenuti potrebbero essere predisposti altri due lavori:

- Analizzare la variazione delle concentrazioni di AOPP con prelievi seriali, ripetuti ad intervalli regolari di tempo, in animali di cui si conosce, attraverso il batteriologico coniugato con SCC e DCC, il reale stato infiammatorio-infettivo,
- Indagare sulle concentrazioni di AOPP in mastiti subcliniche/cliniche (SCC<400000 cc/ml con batteriologico positivo), per comprendere se tali prodotti dell'ossidazione proteica possano essere uno strumento di diagnosi per le mastiti subcliniche e/o strumento di diagnosi precoce per le mastiti cliniche, al fine di attuarne un precoce trattamento.

7. BIBLIOGRAFIA

Affymetrix eBioscience, (2017). Flow cytometry: una panoramica sulla compensazione. <http://www.ricerca.it/Prodotti/Novit%C3%A0/Novit%C3%A0Leggiarticolo/tabid/535/ArticleId/118/Flow-Cytometry-una-panoramica-sulla-compensazione.aspx>.

Ainard, P. R., & Iollet, C. R. (2006). Review article Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 37, 369–400.

Asai, K., Komine, Y., & Kozutsumi, T. (2000). Predominant subpopulations of T lymphocytes in the mammary gland secretions during lactation and intraepithelial T lymphocytes in the intestine of dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 73, 233–240.

Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1999). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313–20316.

Bordignon, M., Dalt, L. Da, Marinelli, L., & Gabai, G. (2014). Advanced oxidation protein products are generated by bovine neutrophils and inhibit free radical production in vitro. *The Veterinary Journal*, 199, 162–168.

Boysen, P., Gunnes, G., Pende, D., Valheim, M., & Storset, A. K. (2008). Natural killer cells in lymph nodes of healthy calves express CD16 and show both cytotoxic and cytokine-producing properties. *Developmental and Comparative Immunology*, 32, 773–783.

Bradley, A. J., Leach, K. A., Breen, J. E., Green, L. E., & Green, M. J. (2007). Papers & Articles Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160, 1–7.

Capeillère-Blandin, C., Gausson, V., Nguyen, A. T., Descamps-Latscha, B., Drüeke, T., & Witko-Sarsat, V. (2006). Respective role of uraemic toxins and myeloperoxidase in the uraemic state. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21, 1555–1563.

Celi, P., & Gabai, G. (2015). Oxidant/Antioxidant Balance in Animal Nutrition and Health: The Role of Protein Oxidation. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 48.

Chalifour, A., Jeannin, P., Gauchat, J.-F., Blaecke, A., Malissard, M., N'Guyen, T., Thieblemont, N., & Delneste, Y. (2004). Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood*, 104, 1778–1783.

Cheng, J. B., Wang, J. Q., Bu, D. P., Liu, G. L., Zhang, C. G., Wei, H. Y., Zhou, L. Y., Wang, J. Z. (2008). Factors Affecting the Lactoferrin Concentration in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 91, 970–976.

Colombo, G., Reggiani, F., Cucchiari, D., Portinaro, N. M., Giustarini, D., Rossi, R., Garavaglia, M.L, Saino, N., Milzani, A., Badalamenti, S., & Dalle-Donne, I. (2017). Plasma protein-bound di-tyrosines as biomarkers of oxidative stress in end stage renal disease patients on maintenance haemodialysis. *BBA Clinical*, 7, 55–63.

Craven, N. (1983). Generation of neutrophil chemoattractants by phagocytosing bovine mammary macrophages. *Research in Veterinary Science*, 35, 310—317.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *ClinicaChimicaActa*, 329, 23-38.

Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidattive/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 55–99.

Davies, M. J., Fu, S., Wang, H., & Dean, R. T. (1999). Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 1151–1163.

De Carvalho, D. D., Sadok, A., Bourgarel-Rey, V., Gattacceca, F., Penel, C., Lehmann, M., & Kovacic, H. (2008). Nox1 downstream of 12-lipoxygenase controls cell

proliferation but not cell spreading of colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 122, 1757–1764.

Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., & Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical Journal*, 18, 1–18.

Denis, M., Parlane, N. A., Lacy-Hulbert, S. J., Summers, E. L., Buddle, B. M., & Wedlock, D. N. (2006). Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114, 111–120.

Dulin, A. M., Paape, M. J., & Weinland, B. T. (1982). Cytospin Centrifuge in Differential Counts of Milk Somatic Cells. *Journal of Dairy Science*, 65, 1247–1251.

Dyce, K. M., Sack, W.O., & Wensing, C. J. (2009). *Testo di Anatomia Veterinaria, Parte seconda-Anatomia Speciale*. Roma: Antonio Delfino Editore medicina-scienze.

Edmondson, P.W., & Bramley, A.J. 2004. Mastitis. In *Bovine Medicine Disease and Husbandry of the Cattle*, ed. A.H. Andrews, 311-326. Oxford: Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company.

Erdei, J., Forsgren, A., & Naidu, A. S. (1994). Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 62, 1236–1240.

Ezzat Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2014). The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 1–31.

Fitzpatrick, J. L., Cripps, P. J., Hill, A. W., Bland, P. W., & Stokes, C. R. (1992). MHC class II expression in the bovine mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 32, 13–23.

Gabai, G., Magro, M., Baratella, D., Miotto, G., Da Dalt, L., Vianello, F. (2015). Oxidized whey proteins as potential biomarkers of oxidative stress: preliminary studies of milk exposure to the myeloperoxidase product HOCl. 1st DairyCare Conference; 2015 Aug 22–23. Copenhagen, Denmark: DairyCare, p. 42.

Galli, F. (2007). Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22, 20–36.

Gào, X., & Schöttker, B. (2017). Reduction-oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews. *Oncotarget*, 8, 51888–51906.

Gonen, E., Nedvetzki, S., Naor, D., & Shpigel, N. Y. (2008). CD44 is highly expressed on milk neutrophils in bovine mastitis and plays a role in their adhesion to matrix and mammary epithelium. *Veterinary Research*, 39, 1–9.

Guzzo, N., Bailoni, L., Mantovani, R., Dalt, L. Da, & Gabai, G. (2015). Oxidized protein biomarkers in the blood and milk of cows supplemented with flaxseed during the dry period. *DairyCare*.

Hagiwara, S., Kawai, K., Anri, A., & Nagahata, H. (2003). Lactoferrin Concentrations in Milk from Normal and Subclinical Mastitic Cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65, 319–323.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed., Oxford University Press.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford University Press.

Hanasand, M., Omdal, R., Norheim, K. B., Gøransson, L. G., Brede, C., & Jonsson, G. (2012). Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta*, 413, 901–906.

Hibbit, K.G., Craven, N., & Batten, E.H. (2004). Anatomy, Physiology and Immunology of the Udder. In *Bovine Medicine Disease and Husbandry of the Cattle*, ed. A.H. Andrews, 311-326. Oxford: Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company.

Kalina, T., Flores-Montero, J., van der Velden, V. H. J., Martin-Ayuso, M., Böttcher, S., Ritgen, M., Almeida, J., Lhermitte, L., Asnafi, V., Mendonça, A., de Tute, R., Cullen, M., Sedek, L., Vidriales, M., Perez, J.J., te Marvelde, J.G., Mejstriková¹, E., Hrusak¹, O., Szczepanski, T., van Dongen, J.J.M., & Orfao, A. (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 26, 1986–2010.

Kelly, A. L., Tiernan, D., O’Sullivan, C., & Joyce, P. (2000). Correlation Between Bovine Milk Somatic Cell Count and Polymorphonuclear Leukocyte Level for Samples of Bulk Milk and Milk from Individual Cows. *Journal of Dairy Science*, 83(12), 300–304.

Kenny, K.P., Tollersrud, T., & Bastida-Corcuera, F.D. (2004). The Enhancement of Bovine Mammary Gland Immunity Through Vaccination. In *Bovine Medicine Disease and Husbandry of the Cattle*, ed. A.H. Andrews, 311-326. Oxford: Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company.

Koess, C., & Hamann, J. (2008). Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *Journal of Dairy Research*, 75, 225–232.

Koskinen, M. T., Wellenberg, G. J., Sampimon, O. C., Holopainen, J., Rothkamp, A., & Salmikivi, L. (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science*, 93, 5707–5715.

Leitner, G., Eligulashvily, R., Krifucks, O., Perl, S., & Saran, A. (2003). Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50, 45–52.

Leitner, G., Shoshani, E., Krifucks, O., Chaffer, M., & Saran, A. (2000). Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 47, 581–589.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464-478.

Li, N., Richoux, R., Perruchot, M.-H., Boutinaud, M., Mayol, J.-F., & Gagnaire, V. (2015). Flow Cytometry Approach to Quantify the Viability of Milk Somatic Cell Counts after Various Physico-Chemical Treatments. *PLOS One*, 10, 1–15.

Machugh, N. D., Mburu, J. K., Carol, M. J., Wyatt, C. R., Orden, J. A., & Davis, W. C. (1997). Identification of two distinct subsets of bovine gamma delta T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology*, 92, 340–5.

Makovec, J. A., & Ruegg, P. L. (2003). Results of Milk Samples Submitted for Microbiological Examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*, 86, 3466–3472.

Mehrzad, J., Janssen, D., Duchateau, L., & Burvenich, C. (2008). Increase in *Escherichia coli* inoculum dose accelerates CD8⁺ T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 91, 193–201.

Molenaar, A. J., Kuys, Y. M., Davis, S. R., Wilkins, R. J., Mead, P. E., & Tweedie, J. W. (1996). Elevation of Lactoferrin Gene Expression in Developing, Ductal, Resting, and Regressing Parenchymal Epithelium of the Ruminant Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 79, 1198–1208.

Napel, J., Haas, Y. De, Jong, G. De, Lam, T. J. G. M., Ouweltjes, W., & Windig, J. J. (2009). Characterization of distributions of somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 92, 1253–1264.

Nickerson, S. C. (1985). Immune mechanisms of the bovine udder: an overview. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187, 41—45.

Olliver-Bousquet, M. (1998). Transferrin and Prolactin Transcytosis in the Lactating Mammary Epithelial Cell. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3, 303–313.

Paape, M. J., Bannerman, D. D., Zhao, X., & Lee, J.W. (2003). The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*, 34, 597–627.

Paape, M. J., Shafer-Weaver, K., Capuco, A. V., Van Oostveldt, K., & Burvenich, C. (2000). Immune Surveillance of Mammary Tissue by Phagocytic Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 480, 259–277.

Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Detilleux, J., & Burvenich, C. (2002). Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7, 109–121.

Persson, K., Carlsson, Å., Hambleton, C., & Guidry, A. J. (1992). Immunoglobulins, Lysozyme and Lactoferrin in the Teat and Udder of the Dry Cow during Endotoxin-Induced Inflammation. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 39, 165–174.

Persson, K., Larsson, I., & Sandgren, C. H. (1993). Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 37, 99–112.

Pilla, R., Malvisi, M., Snel, G. G. M., Schwarz, D., König, S., Czerny, C.-P., & Piccinini, R. (2013). Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *Journal of Dairy Science*, 96, 1653–60.

Pilla, R., Schwarz, D., König, S., & Piccinini, R. (2012). Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal of Dairy Science*, 95, 4410–20.

Piroddi, M., Depunzio, I., Calabrese, V., Mancuso, C., Aisa, C. M., Binaglia, L., ... Galli, F. (2007). Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialysis patients. *Amino Acids*, 32, 573–592.

Pitkälä, A., Gindonis, V., Wallin, H., & Honkanen-Buzalski, T. (2005). Interlaboratory proficiency testing as a tool for improving performance in laboratories diagnosing bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 88, 553–559.

Poli, G., & Bonizzi, L. (2011). Sistemi difensivi "innati", non specifici. In *microbiologia ed immunologia veterinaria (seconda edizione)*, ed. UTET S.p.a, 609-630. Torino: Unione Tipografico-Editrice Torinese.

Poli, G., & Rocchi, M. (2011). Sistemi difensivi acquisiti e specifici. Struttura e funzione del sistema immunitario. In *microbiologia ed immunologia veterinaria (seconda edizione)*, ed. UTET S.p.a, 609-630. Torino: Unione Tipografico-Editrice Torinese.

Priyadarshini, S., & Kansal, V. K. (2002). Lysozyme Activity in Buffalo Milk: Effect of Lactation Period, Parity, Mastitis, Season in India, pH and Milk Processing Heat Treatment. *Journal of Animal Science*, 15, 895–899.

Redelman, D., Butler, S., Robison, J., & Garner, D. (1988). Identification of inflammatory cells in bovine milk by flow cytometry. *Cytometry*, 9, 463–468.

Reznick, A.Z., & Packer, L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymology*, 233, 357-63.

Riboli, F. (1993). Le patologie della mammella. In *La Vacca da Latte*, ed. Succi, G., & Hoffman, I., 521-537. Milano: CittàStudi s.c.r.l.

Riollet, C., Rainard, P., & Poutrel, B. (2001). Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Dairy Science*, 84, 1077–1084.

Rivas, A. L. (2001). Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *J Vet Diagn Invest*, 13, 399–407.

Rollin, E., Dhuyvetter, K. C., & Overton, M. W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*, 122, 257–264.

Rossi, C. R., & Kiesel, G. K. (1977). Bovine immunoglobulin G subclass receptor sites on bovine macrophages. *American Journal of Veterinary Research*, 38, 1023—1025.

Schalm, O.W., Carroll, E.J, & Jain, N.C (1975). *Le mastiti della bovina*. Bologna: Edizioni Agricole.

Schukken, Y. H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., Leighf, J., Petzlg, W., Schubertth, H.J., Sipkah, A., Smithc, D.G.E., Quesnelld, R., Wattsd, J., Yanceyd, R., Zerbeg, H., Gurjara, A., Zadoks, R.N., & Seyfert, H. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144, 270–289.

Selmeci, L. (2011). Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radical Research*, 45, 1115–1123.

Shafer-Weaver, K. A., & Sordillo, L. M. (1996). Enhancing Bactericidal Activity of Bovine Lymphoid Cells During the Periparturient Period. *Journal of Dairy Science*, 79, 1347–1352.

Silanikove, N., Shapiro, F., Shamay, A., & Leitner, G. (2005). Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: Manipulation with casein hydrolyzates. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 1139–1151.

Sjaastad, Ø. V., Sand, O., & Hove, K. (2013). *Fisiologia degli animali domestici*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana.

Sordillo, L. M. (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*, 98, 89–99.

Sordillo, L. M. (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*, (May 2005), 89–99.

Sordillo, L. M., & Aitken, S. L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 104–109.

Sordillo, L. M., & Derosa, D. (1997). Symposium: bovine immunology. Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 80, 1851–1865.

Sordillo, L. M., & Streicher, K. L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7, 135–46.

Sorg, O. (2004). Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327, 649–662.

Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, 207–218.

Steinkamp, J. A. (1984). Flow cytometry. *Review of Scientific Instruments*, 55, 1375–1400.

Talukder, S., Kerrisk, K. L., Gabai, G., Fukutomi, A., & Celi, P. (2015). Changes in milk oxidative stress biomarkers in lactating dairy cows with ovulatory and an-ovulatory oestrous cycles. *Animal Reproduction Science*, 158, 86–95.

Taniguchi, T. (1995). Cytokine Signaling Through Nonreceptor Protein Tyrosine Kinases Published by: American Association for the Advancement of Science Cytokine Signaling Through Nonreceptor Protein Tyrosine Kinases. *Science*, 268, 251–255.

Taylor, B. C., Keefe, R. G., Dellinger, J. D., Nakamura, Y., Cullor, J. S., & Stott, J. L. (1997). T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cellular Immunology*, 182, 68–76.

Università degli Studi di Padova, (2017). Stalla didattica. <http://www.aziendagraria.unipd.it/node/2329>.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.

Valtriani, C., & Hurle, C. (1997). Citofluorimetria a flusso. *Caleidoscopio Italiano*, 113, 1–66.

Vankayalapati, R., Klucar, P., Wizel, B., Weis, S. E., Samten, B., Safi, H., ... Barnes, P. F. (2003). NK Cells Regulate CD8⁺ T Cell Effector Function in Response to an Intracellular Pathogen. *Journal of Immunology*, 172, 130–137.

Viguiet, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & Kennedy, R. O. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27, 486–493.

Wachter, C.M., McDaniel, B.T., Whitlow, L.W., Pettyjohn, S., 1999. Genetics of antioxidant activity in Holsteins and Jerseys: associations with various traits. *Journal of Dairy Science* 82 (Suppl. 1), 31.

Wilkerson, M. J. (2012). Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 42, 53–71.

Wilkerson, M.J., & Mastrorilli, C. (2010). Cluster of Differentiation (CD) Antigens. In Schalm's veterinary hematology- 6th edition, ed. D.J. Weiss & K.J. Wardrop, 20-26. Iowa: Blackwell Publishing Ltd.

Winterbourn, C. C. (2002). Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology*, 182, 223–227.

Witko-Sarsat, V., Friendlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49, 1304-1313.

Witko-Sarsat, V., Friendlander, M., Nguyen-Khoa, T., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Drüeke, T., & Descamps-Latscha, B. (1998). Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *Immunology*, 161, 2524-2532.

Worku, M., Paape, M. J., Filep, R., & Miller, R. H. (1994). Effect of in vitro and in vivo migration of bovine neutrophils on binding and expression of Fc receptors for IgG2 and IgM. *American Journal of Reproductive Immunology*, 55, 221—226.

Yamaguchi, T., Hiratsuka, M., & Asai, K. (1999). Differential Distribution of T Lymphocyte Subpopulations in the Bovine Mammary Gland During Lactation. *Journal of Dairy Science*, 82, 1459–1464.

Yan, L.J. (2013). Analysis of oxidative modifications of proteins. *Current Protocol in Protein Science*, 56, 14.4.1–14.4.28.

Yang, T. J., Ayoub, I. a, & Rewinski, M. J. (1997). Lactation stage-dependent changes of lymphocyte subpopulations in mammary secretions: inversion of CD4⁺/CD8⁺ T cell ratios at parturition. *American Journal of Reproductive Immunology*, 37, 378–83.

Zecconi, A., Hamann, J., Bronzo, V., Moroni, P., Giovannini, G., & Piccinini, R. (2000). Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 480, 287–93.

8. RINGRAZIAMENTI

Sembra strano, la parte più complicata da scrivere della tesi è proprio questa; liberi dal vincolo delle citazioni e del linguaggio scientifico ci ritroviamo a dover mettere per iscritto il dialetto del nostro cuore, arduo è il compito, ma proverò a dare un'idea di quel che provo attraverso un'inanimata tastiera.

Innanzitutto, per me non è doveroso, ma semplicemente piacevole ringraziare la Prof.ssa Gelain, la sua gentilezza e competenza hanno reso piacevole il lavoro di tesi. Immerso in un perenne stato di ansia pre esame e bassa autostima sono stato più di una volta invitato a non abbattermi. Mai avrei detto di aver potuto imparare a preparare, acquisire ed analizzare campioni al citofluorimetro; semplicemente per il fatto che tale macchina ed i grafici che vi scaturivano costituivano per me, in termini scherzosi, uno strano connubio tra scienza, arte e magia. È proprio grazie alla Prof.ssa Gelain, insieme ad un'altra persona che in seguito menzionerò, che quello che alla prima impressione può sembrare impossibile è diventato per me pratica quotidiana. Ringrazio il Prof. Gabai per essere stato un l'ideatore di questo progetto di tesi. Mi ha molto colpito l'interesse, la curiosità e l'entusiasmo simile a quello di un bambino che ha posto non solo in questo progetto di tesi, ma anche in quello di altri miei colleghi. Ringrazio il Dott. Bonsembiante per avermi costantemente seguito in laboratorio ed avermi insegnato con semplicità concetti difficili da comprendere della citofluorimetria. Grazie a lui il lavoro svolto in laboratorio e nella scrittura della tesi è risultato lieve ed a tratti divertente. È stata assai gradita la sua capacità critica resa meno dura dal fare scherzoso.

Ringrazio la Dott.ssa Laura Da Dalt per la sua disponibilità nel guidarmi ed insegnarmi le metodiche di laboratorio per quanto riguarda le analisi delle AOPP e dei carbonili. Debbo ringraziarla soprattutto per aver toccato con mano e sopportato, in contrasto con la sua velocità ed efficienza, la mia lentezza e pedanteria nell'esecuzione dei test di laboratorio.

Infine, ringrazio la Signorina Chiara Fiorese, la Dott.ssa Nadia Borsato ed il Prof. Enrico Novelli per la disponibilità nella raccolta dei campioni di latte.

Ringrazio la Dott.ssa Veronica Segat ed il Prof. Mattana Claudio per aver espresso giudizi stilistici e pratici sulla scrittura della tesi.

Ringrazio con il cuore tutti i miei amici e familiari che hanno condiviso con me gioie, dolori, pianti e sorrisi. In particolare, tutti gli amici che sopportano ed hanno

sopportato per anni il mio carattere e le mie stravaganze senza perdere la speranza, trattando i miei difetti alla stregua di virtù, subendo i miei quotidiani scherzi. Ricordo specialmente l'esperienza più divertente provata della mia vita insieme alle persone che mi hanno accompagnato sulla via di Santiago. Mi sento particolarmente in dovere di ringraziare mia madre per avermi cresciuto e supportato sia psicologicamente che, scontato a dirsi, economicamente. Ho avuto inoltre la fortuna nella vita di avere a fianco una delle persone più gentili al mondo, mia sorella. Un grazie particolare insieme ad il mio affetto alla sopracitata Dott.ssa Veronica Segat, mio sostegno e scrigno di tenerezza in questi ultimi anni d'università.

I miei ringraziamenti non finiscono con la mia famiglia ed amici, ma si estendono anche ad altri animali. In particolare, esprimo gratitudine ai miei onoterapisti di fiducia (Napoleone detto "Napo", Violetta, Rasha, Vichi, Aragon ed Itaca) che sotto compenso alimentare hanno fornito preziose somministrazioni d'affetto. Un grazie anche ad i miei canarini, artefici canori delle mie sveglie estive ed alle mie tartarughe, efficienti operatori ecologici del giardino.

La più sentita gratitudine a Saverio, mio migliore amico, mio mentore e padre, artefice indiscusso del mio modo di pensare e della mia conoscenza, mi insegnò ad apprezzare la magica bellezza degli animali e della natura.