

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE FISIologiche, BIOCHIMICHE
E CELLULARI

Scuola di DOTTORATO DI RICERCA IN:
“Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche”
(XV CICLO)

**Allestimento e trial clinico di un
vaccino a DNA per il trattamento
della leishmaniosi canina**

Coordinatore: Prof. Bruno Masala

Tutor: Prof. Marco Pittau

Corelatori: Dott. Bernardo Chessa
Dott.ssa Laura Manna

Tesi di dottorato della
Dott.ssa Ilaria Michela Piras

Anno Accademico 2011-2012

Indice

Introduzione

Capitolo 1

Leishmania infantum

- 1.1 - Classificazione
- 1.2 - Morfologia e biologia
- 1.3 - Ciclo cellulare
- 1.4 - La vita nel pasto di sangue e la trasmissione
- 1.5 - La vita nel vacuolo: aspetti metabolici
 - 1.5.1 - L'ambiente del vacuolo parassitoforo
 - 1.5.2 - Aspetti metabolici degli amastigoti

Capitolo 2

Immunologia dell'infezione da Leishmania

- 2.1-Interfaccia macrofago/*Leishmania*: l'immunità innata
 - 2.1.1-Ingresso
 - 2.1.2-Alterazione del fagosoma
 - 2.1.3-Alterazioni delle cascate di attivazione
 - 2.1.4-Alterazione della presentazione dell'antigene e reiezione
- 2.2-Altri ospiti
- 2.3-Il macrofago, il linfocita e l'immunità adattativa
- 2.4-L'immunità cellulo-mediata
 - 2.4.1-Popolazioni linfocitarie e citochine del sangue periferico
 - 2.4.2-L'immunità organo specifica

2.5-L'immunità umorale

Capitolo 3

La leishmaniosi canina

3.1 - Patogenesi

3.2 - Sintomatologia

3.3 - Rilievi ematologici e biochimici

3.4 - La Diagnosi

3.4.1 - Esame fisico e diagnostica per immagini

3.4.2 - Analisi di laboratorio

3.4.3 - Analisi etologica

3.5 - La terapia

3.6 - L'immunoterapia

Capitolo 4

I vaccini

4.1- Vaccini per la profilassi della leishmaniosi nell'uomo

4.2-Vaccini per la profilassi della leishmaniosi nel cane

4.2.1-Vaccini di prima generazione

4.2.2-Vaccini di seconda generazione

4.2.3-Vaccini di terza generazione

4.3-I vaccini a DNA

4.3.1-Come nascono i vaccini a DNA

4.3.2-Caratteristiche dei vaccini a DNA

4.3.3-Il meccanismo dei vaccini a DNA

Capitolo 5

Scopo del lavoro

Capitolo 6

Materiali e Metodi

- 6.1-Terreni e reagenti
- 6.2-Costruzione dei plasmidi
- 6.3-Trasformazione dei cappi batterici
- 6.4-Purificazione del DNA plasmidico
- 6.5-Espressione *in vitro* del gene di fusione cpb1-po
- 6.6-Trial clinico
- 6.7-Protocollo vaccinale
- 6.8-Prelievi
- 6.9-Culture parassitarie
- 6.10-Estrazione del DNA
- 6.11-Isolamento del RNA e sintesi del cDNA
- 6.12-Disegno dei primers e delle sonde
- 6.13-Analisi in real-time PCR
- 6.14-Analisi statistica
- 6.15-Espressione e purificazione della proteina di fusione CPB1-PO
- 6.16-SDS PAGE e Western Blot
- 6.17-Elisa assay

Capitolo 7

Risultati

- 7.1-Costruzione dei plasmidi codificanti il gene di fusione cpb1-po
- 7.2-Espressione in vitro dell'antigene CPB1-PO
- 7.3-Valutazione del clinica score
- 7.4-Valutazione del carico di DNA di *Leishmania*
- 7.5-Valutazione del titolo anticorpale specifico tramite IFAT
- 7.6-Valutazione degli mRNA delle citochine ne PMCB
- 7.7-Espressione, purificazione e immunoreattività dell'antigene rCPB1-PO
- 7.8-Valutazione dell'antigene rCPB1-PO in ELISA assai

Capitolo 8

Discussione e conclusioni

Bibliografia

Introduzione

La leishmaniosi è una malattia protozoaria dalla patogenesi complessa trasmessa attraverso la puntura di insetti flebotomi. *Leishmania infantum* è agente causale della leishmaniosi canina identificato già dagli inizi del XX secolo nei paesi del bacino Mediterraneo e in seguito anche nel Medio Oriente in Asia Centrale ed in Cina. Endemica nelle Americhe è *Leishmania chagasi* una specie geneticamente indistinguibile da *L.infantum*. *Leishmania infantum/chagasi* è anche agente causale della leishmaniosi viscerale nell'uomo, zoonosi in cui il cane rappresenta il principale reservoir. Nell'uomo la leishmaniosi costituisce un complesso di manifestazioni cliniche in cui si distinguono forma cutanea (CL) e muco-cutanea (MCL), che sono forme di malattia a esito invalidante e mutilante, e una forma viscerale (VL) che è spesso letale se non trattata. Queste malattie sono causate da diverse specie di *Leishmania* diffuse in 88 paesi e che minacciano una popolazione di 350 milioni di persone con 1,5 milioni di nuovi casi di CL e 500.000 di VL ogni anno (WHO, 2011) . Il controllo della leishmaniosi canina è basato sul trattamento e il sacrificio degli animali infetti, le

campagne di vaccinazione sono solo una conquista recente. La vaccinazione è considerata lo strumento più efficace in termini di costo-beneficio per il controllo della leishmaniosi canina e umana. (M. Gramiccia and L. Gradoni, 2005)

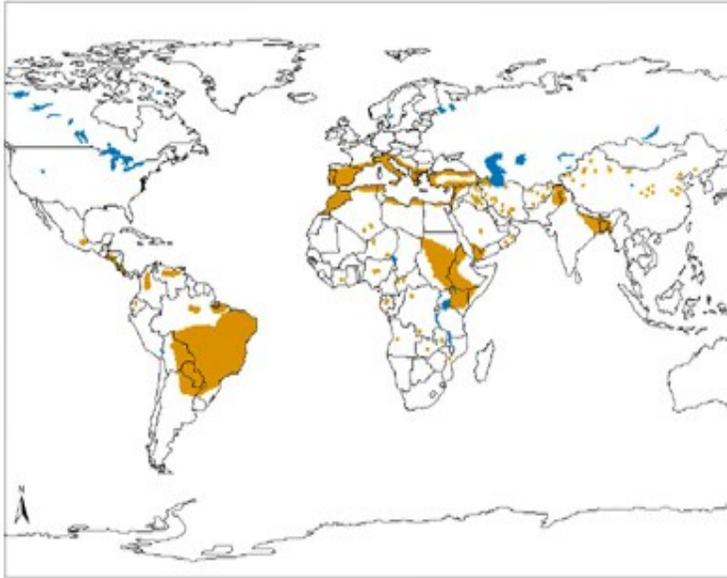


Fig.1: Diffusione geografica della leishmaniosi: da WHO, 2011

1.1 Classificazione

Il protozoo *Leishmania* appartiene alla famiglia dei Trypanosomatidi, phylum Mastigophora, regno Protista. Come tutti i membri dell'ordine Kinetoplastida, cui appartiene, è caratterizzato dalla presenza di un evidente organello mitocondriale: il kinetoplasto. Almeno in uno stadio del ciclo cellulare tutti i membri di questo gruppo sono rappresentati da una cellula affusolata e flessibile dotata di uno o due flagelli che emergono da una prominente invaginazione della membrana plasmatica: la tasca flagellare. Sono state scoperte e classificate più di trenta specie di *Leishmania* fino ad ora, e di queste almeno dieci sono di significativa importanza medica o veterinaria (Bates and Ashford, 2006). Classicamente le varie specie di *Leishmania* sono state divise in tre distinti subgenera in relazione a quale parte dell'intestino dell'insetto colonizzano nella forma promastigote (Lainson et al., 1977; Lainson et al. 2006); una classificazione successivamente confermata dall'analisi filogenetica condotta tramite sequenziamento del DNA (Noyes et al., 1997): *Leishmania* subgenere *Leishmania* cui appartengono le specie più studiate e per cui sono disponibili il maggior numero di informazioni, *Leishmania* sub genere *Vianna* che sono anch'essi parassiti dei mammiferi *Leishmania* subgenere *SauroLeishmania* che infettano rettili come ospiti vertebrati, Fig.2.

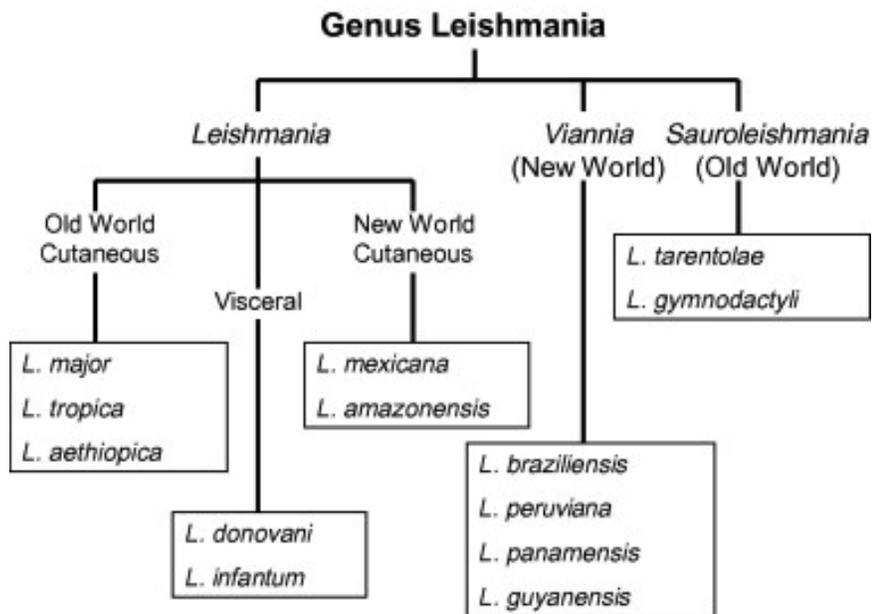


Fig.2: Classificazione del genere Leishmania

1.2 Morfologia e biologia

Tutti i membri dei Kinetoplastidae sono parassiti obbligati e sono hanno in comune con gli altri protisti tutti i tipici gli organelli eucariotici : un citoplasma racchiuso da una membrana trilaminare, un unico mitocondrio, un reticolo endoplasmatico e un apparato di Golgi; il nucleo centrale è

isolato da una membrana porosa presenta un unico nucleolo evidente. Altre caratteristiche di questo gruppo sono la presenza di un unico mitocondrio ramificato; l' inusuale DNA mitocondriale, il Kinetoplasto (Fig.3); un RNA editing complesso; la trascrizione policistronica di tutti i geni che codificano proteine; lo trans-splicing di tutti gli RNA trascritti; le vie metaboliche glicolitiche connesse ai glicosomi.

Come gli altri Kinetoplastidae *Leishmania* ha una membrana plasmatica la cui struttura e composizione è paragonabile a quella di tutti gli altri eucarioti, eccetto che per la presenza di microtubuli intimamente adesi alla superficie plasmatica della membrana e distribuiti su tutto il corpo cellulare ad eccezione della tasca flagellare. I microtubuli interconnessi fra loro e con la membrana plasmatica formano un struttura elicoidale lungo l'asse cellulare è chiamata "corsetto sub-pellicolare". Questa organizzazione di microtubuli, è presente durante il ciclo cellulare ed è ereditata in maniera semiconservativa dalle due cellule figlie. La funzione di questa struttura è di sottendere al traffico da e verso la membrana in relazione con la tasca flagellare (Field and Carrington, 2004).

La superficie esterna della membrana di tutti i tripanosomatidi è protetta da un rivestimento formato da strati di proteine e glicolipidi ancorati alla superficie tramite glicosilfosfatidilinositolo (GPI) o/e GPI- glicolipidi liberi

(Ilgoutz, 2001) che costituisce anche il primario un mezzo di interazione ospite parassita. La composizione di questo rivestimento è regolato strettamente durante tutto il corso del ciclo vitale del parassita: i lipofosfoglicani ancorati tramite GPI (McConville et al., 1991) ad esempio sono le macromolecole più abbondanti sulla superficie dei promastgoti di *Leishmania*, mentre le molecole di GPI libero sono invece il maggior costituente della superficie degli amastigoti. Gli amastigoti comunque acquisiscono glycosfyngolipidi dai loro ospiti, i macrofagi e li incorporano nel loro esoplasma (Ilgouz et al., 2001). Sono note molte altre macromolecole di superficie in *Leishmania* spp., incluse GIPL e lipifosfoglicano (LPG), così come proteine di membrana quali il proteofosfoglicano (PG), MSP/GP63 (major surface protein 63-kDa glycoprotein), PSA-2/GP46 (promastigote surface antigen-2 or 46-kDa glycoprotein) e amastin surface proteins che sono espresse dagli amastigoti durante il loro sviluppo e sono uniche tra i tripanosomatidi. Questi glicoconiugati hanno un ruolo importante nella sopravvivenza del parassita ad ambienti ostili quali l'intestino del parassita o il fagolisosoma macrofagico (Vickerman, 1969; Capul et al., 2007; Devault et al, 2008).

I promastigoti di *Leishmania* sono rivestiti da uno spesso glicocalice costituito principalmente da molecole glicoconiugate. Queste molecole

includono il Lipofosfoglicano (LPG), il Proteifosfoglicano (PPG), la metalloproteinasi gp63 e i lipidi del glicofosfatidilinositolo (GIPLs). La maggior parte di queste molecole sono ancorate alla superficie del parassita tramite glicofosfatidilinositolo (GPI). Altri prodotti di secrezione del parassita sono i fosfoglicani proteo-coniugati (PGs), i proteifosfoglicani secreti (PPGs) e la fosfatasi acida (sAP). La molecola “ancora” di GPI è costituita da 1-O-alkil-2-lyso- fosfatidilmioinositolo con un core eptasaccaridico al quale si legano lunghi polimeri di PG composti da 15-30 unità. Il polimero termina con una molecola oligosaccaridica legata all'estremità e le unità di PG ripetute sono spesso modificate con altri zuccheri che sono specie e stadio-specifiche. Il LPG è la molecola più abbondante sia nei promastigoti prociclici che metaciclici giocando un ruolo importante nella sopravvivenza dell'insetto vettore e nell'infezione. La sopravvivenza degli amastigoti nel macrofago invece sono favorite da molecole di GPI libero e PPG che sono over-esprese sulla loro della superficie.

Immerse nella membrana plasmatica attraverso domini α -elica ci sono le proteine transporter di membrana, indispensabili per mediare il traffico molecolare fuori e dentro la membrana : acquisire tutti quei molecole troppo grandi o troppo idrofilici per attraversare la membrana, espellere metaboliti, creare gradienti ionici, trasportare di farmaci (Landfear, 2004, 2008). Si

calcola che tra il 2 e il 2,5% delle proteine codificate dal genoma dei tripasomatidi siano proteine transporter la cui espressione è influenzata dalle condizioni ambientali. Il protozoo ha quindi a disposizione un vasto assortimento di geni per le proteine transporter che gli permettono di variarne il fenotipo in accordo con la fase del ciclo cellulare.

Il flagello è un organo motorio che tramite oscillazioni ondulatorie permette un movimento anterogrado al parassita. Il flagello emerge dal corpo basale attraverso la tasca flagellare (Landfear et al, 2001; Gull, 2003) dal polo anteriore della cellula. Una rete di connessioni membranose e citoscheletriche che tiene saldamente uniti il flagello al corpo cellulare tutta la sua lunghezza nella cosiddetta “zona di attacco flagellare” (FAZ) (Ralston, 2009). Il movimento del flagello è determinato da un assonema che ha la tipica struttura data da un microtubulo centrale e nove coppie di microtubuli periferici (Portman, 2010). Integrato nel flagello è il “paraxial rod”, una struttura a matrice filamentosa connessa con l’assonema e necessaria per la sopravvivenza del protozoo (Portman et al., 2010; Oberholzer et al., 2010). La membrana flagellare, pellicolare e della tasca flagellare sono fisicamente connesse anche se sono chimicamente, strutturalmente e funzionalmente diverse e fanno tutte parte della membrana plasmatica. Il flagello non provvede solo alla motilità ma è coinvolto nell’interazione ospite parassita,

nella morfogenesi, nei meccanismi di elusione del sistema immunitario (Ralston KS et al, 2009). Il movimento e lo sviluppo del parassita sono guidati da segnali crociati tra parassita e ospite, sia nel caso dell'insetto sia nel caso dell'ospite mammifero. Il flagello si è rivelato essere una piattaforma per la ricezione dei segnali ambientali: verso il flagello infatti sono stati identificati pathway molecolari di segnalazione dei nucleotidi ciclici e del calcio che vengono trasmessi a livello intracellulare attraverso le strutture di connessione del flagello (tasca flagellare, FAZ, kinetoplasto e mitocondrio) (Ralston et al., 2009; Portman et al, 2008). Questo dialogo intracellulare permette anche al flagello di dirigere e organizzare il mitocondrio e il kinetoplasto per la segregazione durante la citocinesi (Moreira-Leite FF et al, 2001). La tasca flagellare rappresenta sito esclusivo dell'endocitosi e della secrezione nei tripanosomatidi (Webster, 1993) ed è stato a lungo discusso di come probabilmente i movimenti del flagello influenzino l'ingresso nella tasca flagellare (Ralston et al, 2009): mutanti di *T. cruzi* privi di movimento flagellare perdono la capacità di evadere il sistema immunitario assieme alla capacità di internalizzare VSG legata alle immunoglobuline (Webster P, 1993).

I tripanosomatidi possiedono numerosi geni condivisi ancestrali comuni con piante e/o batteri (Wilson et al, 1996; Maldonado et al, 2001). Molti dei

prodotti di questi geni acquisiti orizzontalmente adesso funzionano come enzimi nei glicosomi, organelli specializzati ed esclusivi dei membri dei kinetoplastidae. I glicosomi sono strutture sferiche costituite da una densa matrice proteica circondata da un singolo bilayer fosfolipidico e privo di DNA (Opperdoes, 1977; Michels, 2005). Nonostante i glicosomi siano evolutivamente relazionati ai perossisomi degli eucarioti superiori e ai gliossisomi delle piante, si distinguono per possedere il macchinario glicolitico che gli permette di convertire il glucosio in piruvato in modo molto più efficiente rispetto a molti eucarioti. Il proteoma del glicosoma di *Leishmania major* conferma la presenza della maggior parte di enzimi glicolitici (Parsons M, 2004). Il glicosoma coopera col mitocondrio e col citoplasma nel metabolismo energetico del kinetoplastidi. Nello stadio parassitico dell'insetto i glicosomi di *Leishmania* sono capaci di metabolizzare sia amminoacidi che zuccheri per supplementare l'energia libera. I glicosomi hanno anche funzione relativa alla biosintesi delle pirimidine, recupero delle purine, sintesi dei lipidi e ossidazione degli acidi grassi (Parsons, 2004; Michels et al, 2000). Gli amastigoti hanno una più elaborato macchinario metabolico energetico e dei carboidrati grazie ad altre chinasi ATP dipendenti (fosfoenolpiruvato carbossichinasi and piruvato fosfato dichinasi) che si possono trovare nei glicosomi, mentre la

fosfoglicerato chinasi (PGK) è ricollocata nel citoplasma (Michels et al, 2000). Le proteine del glicosoma sono codificate nel nucleo e vengono sintetizzate dai ribosomi nel citosol e traslocate nel glicosoma tramite presenza di una sequenza segnale aggiunta nelle modificazioni post-traslazionali che ne permette il legame ai recettori glicosomali. I mitocondri ospitano i sistemi molecolari per la produzione dell'energia tramite fosforilazione ossidativa, inoltre, sintetizza metaboliti chiave e i gruppi ferro-sulfidrilici e può essere riserva per i fattori che amplificano le molecole per la morte cellulare programmata (De Souza, 2008). *Leishmania* come gli altri tripanosomatidi ha un unico mitocondrio ramificato, peculiare per la densità della matrice ed il numero delle creste che possono aumentare o diminuire come le dimensioni dell'organello stesso in base alle esigenze metaboliche legate alla fase del ciclo cellulare. La separazione del Dna mitocondriale duplicato è diretta dal corpo basale e la divisione mitocondriale sembra essere un check point per la citocinesi (Schneider et al, 2008; Chanez et al, 2006). La maggior parte delle proteine mitocondriali sono sintetizzate dai ribosomi del citosol e quindi trasportate nell' organello. Molte altre proteine sono sintetizzate a livello mitocondriale, ma poiché il genoma mitocondriale ha perso tutti i geni per i tRNA, i tripanosomatidi hanno bisogno di importare del citosol l'intero set di tRNA mitocondriale.

Adibito al trasporto del tRNA è un complesso di sub-unità proteiche di origine mitocondriale chiamato RNA import complex (RIC), ben studiato in *L. tropica* (Adhya, 2008) che è in grado di trasportare tRNA e altri piccoli RNA attraverso membrane sia naturali che artificiali. I tRNA mitocondriali derivano dai tRNA di tipo eucariotico codificati nel nucleo dagli stessi geni che codificano per i tRNA citoplasmatici e devono però funzionare nel contesto di traduzione di tipo batterico mitocondriale (Bruske et al, 2009). Spesso i tRNA mitocondriali e i loro precursori citoplasmatici sono fisicamente diversi perché sottoposti a modificazioni mitocondrio-specifiche che includono metilazioni, tiolazioni e la sostituzione delle citosine con uridine (Bruske et al., 2009; Alfonzo et al., 1999; Charrière et al., 2006). Il kinetoplasto è un addensamento di DNA mitocondriale dalla forma discoidale. Il Dna kinetoplastidico (kDNA) ha una densità più intensa rispetto a quello nucleare, ha un diverso rapporto di basi e un diverso grado di rinaturazione. Diversamente da qualsiasi altro DNA in natura il kDNA è organizzato in molecole circolari in uno stato rilassato e concatenate una all'altra a formare un'unica rete. Esistono due tipi di anelli di DNA denominati maxicircoli e i microcircoli. Ci sono centinaia di microcircoli che hanno una dimensione variabile tra 0,5 e 10 kb e solo poche decine di maxicircoli che hanno un peso molecolare che oscilla tra le 20 ed le 40 kb

(Charrière et al., 2006). I maxicircoli corrispondono al DNA mitocondriale che codifica due rRNA con tutte le subunità proteiche della catena respiratoria così come alcuni RNA guida (gRNA). I minicircoli codificano per i gRNA che modificano i trascritti dei maxicircoli attraverso un intenso processo di RNA editing basato su un meccanismo di inserzione/delezione delle U al posto delle C che serve per ricostruire Open Reading Frame (ORF) riconoscibili (Lukes et al., 2005; Stuart et al., 2002). Un altro meccanismo di RNA editing consiste nella modificazione del C34 in U34 dell'anticodone del tRNA^{trp} importato dal citoplasma, che permette di leggere come triptofano il codone di stop (Lukes et al., 2005). A differenza della maggioranza dei eucarioti i tripanosomatidi trascrivono i geni codificanti per le proteine come policistroni (Martinez-Calvillo et al., 2010; Figueroa-Angulo et al., 2003). La maturazione del pre-mRNA nucleare in mRNA prevede un processo di splicing. Il cis-splicing, che prevede la rimozione degli introni, avviene raramente probabilmente perché solo pochissimi geni di tripanosomatidi hanno sequenze introniche (Stuart et al., 2005). Per trasformare il pre-mRNA in unità monocistroniche traducibili in proteina è necessario un processo di trans-splicing che è condotto tramite transesterificazione in due fasi, similmente a quanto avviene nel cis-slicing, con un intermedio forma di Y (Liang et al., 2003). Attraverso lo trans-

splicing vengono prodotti mRNA codificanti e traducibili dotati di una sequenza esone di 39nt e un'estemità 3' poliadenilata. Tutti i processi di RNA splicing sono svolti nello splisossoma che è costituito da cinque piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNPs spliceosome nuclear particles) e da proteine non appartenenti alle snRNPs (Liang et al., 2003; Luz-Ambrósio et al., 2009)

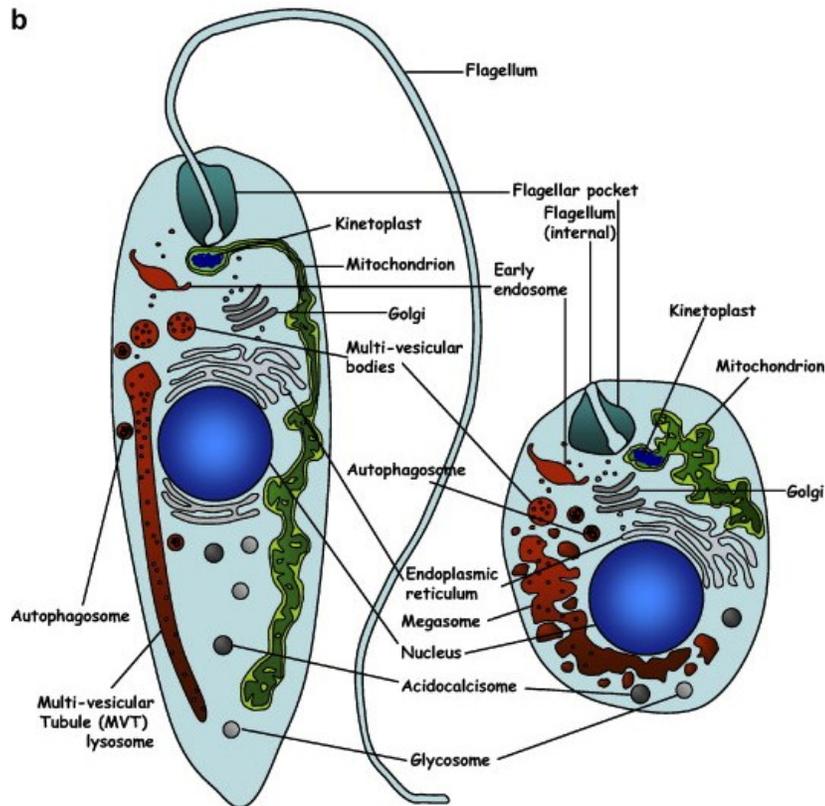


Fig.3: Morfologia e struttura della forma amastigote e promastigote di *Leishmania*: da Besteiro, 2007

1.2 Ciclo cellulare

Leishmania spp sono parassiti digenei che si sviluppano come forme rotondeggianti aflagellate nei fagosomi dei macrofagi dei vertebrati e sotto forma di promastigoti flagellati nell'intestino delle femmine di flebotomo (Chance and Evans, 1999). Le specie del genere *Leishmania* vanno incontro a grandi cambiamenti morfologici durante le varie fasi del ciclo cellulare, ma tutte le forme conservano un nucleo, un kinetoplasto e un flagello. Anche gli amastigoti possiedono un flagello che è interno e funzionale. Quasi tutti gli studi sul ciclo cellulare di *Leishmania* sono stati condotti su colture di promastigoti, perché tecnicamente più semplici da coltivare. Uno degli studi più recenti condotti su *Leishmania mexicana* (Wheeler et al., 2011) si basa su un approccio morfometrico e dimostra che ogni morfologia identificabile in una popolazione in crescita corrisponde inequivocabilmente ad un singolo stadio del ciclo cellulare: la lunghezza cellulare aumenta durante la fase G1 (da 6 a 12 μ m) , rimane costante nella fase S accompagnata però da un aumento della quantità di DNA; la lunghezza diminuisce accompagnata da un aumento della larghezza (3-5 μ m) durante la mitosi. La lunghezza del flagello aumenta durante la fase G1

e si ferma durante la fase S; il nuovo flagello emerge dalla tasca flagellare verso la fine della fase S ed è molto più corto dal vecchio flagello (5-13 μm) cosicché la divisione cellulare darà origine a due cellule figlie diverse per la lunghezza del flagello.

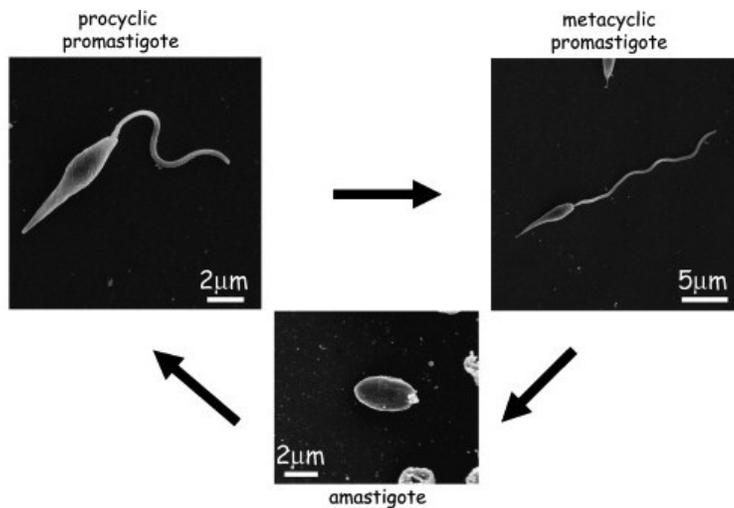


Fig.4: Fasi del ciclo cellulare di *Leishmania*: da Besteiro, 2007

La crescita del flagello non si completa in un unico ciclo cellulare ma si estende progressivamente durante numerosi cicli (Wheeler et al., 2011). Wheeler et al. inoltre, riferendosi al nucleo, al kinetoplasto e al flagello come marker (che in *Leishmania* come negli altri tripanosomatidi replicano una sola volta per ciclo cellulare) dimostra come la crescita del flagello inizi

per prima durante la fase G1, seguita dalla duplicazione del DNA nel nucleo e nel kinetoplasto, che avvengono nello stesso momento, indicando sincronia nella loro fase S. La mitosi, identificata con la segregazione del DNA durante l'anafase, segue immediatamente la fine della fase S senza l'interposizione di nessuna fase G2. La divisione del kinetoplasto avviene subito dopo l'anafase nucleare, cioè dopo che la mitosi ha avuto inizio ed è completa prima della sua fine. La mitosi e la divisione del kinetoplasto invece sono asimmetriche (Robinson et al., 1995) Fig.4.

1.3 La vita nel pasto di sangue e la trasmissione

L'unico meccanismo di trasmissione di *Leishmania* finora accertato è attraverso la puntura dei flebotomi (Bates and Rogers, 2004). I flebotomi sono insetti ditteri appartenenti alla famiglia dei Psychodidae a cui attualmente si ascrivono circa 700 specie. Di queste almeno il 10% è stato incriminato quale vettore di leishmaniosi con vari gradi di certezza, ma di queste solo 30 specie sono quelle in cui è stata dimostrata la capacità di veicolare *Leishmania*.

Lo sviluppo di *Leishmania* nell'ospite vettore avviene nei flebotomi femmine, appartenenti al genere *Phlebotomus* nel Vecchio Continente e

Luzmonia nelle Americhe che acquisiscono i parassiti nutrendosi su ospiti mammiferi infetti durante la ricerca del pasto di sangue. Le Leishmanie sono acquisite dall'insetto nella forma di amastigoti che vivono all'interno dei fagolisosomi di macrofagi che circolano nel sangue periferico. I flebotomi si nutrono inserendo nella pelle dell'ospite le parti seghettate dell'apparato buccale e agitandole fino a produrre delle microlesioni verso le quali arriva il sangue dai capillari superficiali e assieme ai macrofagi e altre cellule fagocitarie (Lane, 1993). Gli amastigoti protetti all'interno dei macrofagi o in forma libera vengono risucchiati dall'insetto insieme alle altre componenti del sangue e finiscono nell'addome. L'aumento del pH e l'abbassamento della temperatura presenti nell'intestino medio dell'insetto scatenano lo sviluppo del parassita nella forma mobile del promastigota (Kamhawi, 2006). In questa prima fase il promastigote è detto prociclico, ed è una forma replicativa poco motile che si sviluppa nell'intestino medio durante la digestione del pasto di sangue (Secundino et al. 2005). Durante tutta questa fase l'insetto supplementa la sua alimentazione con zuccheri assunti dalle piante e perciò questa fase è chiamata, oltre che "fase del pasto di sangue", "fase del pasto di zuccheri".

I promastigoti assieme al pasto di sangue e sono racchiusi da una maglia di proteine e chitina secrete dall'epitelio intestinale del dittero: la matrice

peritrofica. Dopo alcuni giorni i promastigoti rallentano il ritmo di replicazione e si trasformano in forme allungate ed estremamente mobili, i promastigoti nectomonadi, che si affrancano dal pasto di sangue attraversando la matrice peritrofica le cui maglie vengono allentate da alcune chitinasi di secreta dai promastigoti (Schlein et al., 1991) e pare anche da chitinasi endogene del flebotomo stesso (Ramalho-Ortigao et al., 2005). Queste forme migratorie risalgono l'intestino medio attaccandosi ai microvilli dell'epitelio intestinale fino a raggiungere la valvola stomoidale (o cardia) che separa l'intestino medio da quello anteriore. I promastigoti nectomonadi sono i veri mediatori dello stabilimento della fase infettiva. In questa fase è determinante soprattutto dalla grande capacità adesiva del parassita che gli permette di evitare l'escrezione assieme al pasto di sangue. In particolare il LPG lipopofosfoglicano glucoconiugato presente sulla superficie del promastigote di *Leishmania major* sembra coinvolto nel legame con la galectina dell'epitelio di *Phlebotomus papatasi* (Kamhawi, 2004) anche se è stato dimostrato che in altre specie l'adesione può essere mediata da altre molecole (Myskova et al., 2007). I promastigoti metaciclici perdono queste capacità adesive per favorire il loro rilascio dall'apparato digerente del vettore, con delle semplici modificazioni nella sintesi del LPG. Raggiunta la membrana stomoidale i nectomonadi differenziano in

promastigoti leptomonadi responsabili della secrezione del promastigote secretory gel (PSG; Roger ME et al., 2002), una sostanza che ha un ruolo chiave nella trasmissione dei parassiti attraverso il vettore. Una parte dei nectomonadi invece, differenzia nei promastigoti aptomonadi, che sviluppano una struttura emidesmosomale a partire dall' espansione dell'estremità flagellare e che utilizzano per aderire alla parete della valvola stomoidale. I promastigoti aptomonadi sono considerati una forma altruistica di promastigote, in quanto giocano un ruolo importante nel meccanismo di trasmissione ma non sono forme infettanti. Per quanto riguarda i promastigoti leptomonadi, solo una parte di essi matura nella forma metaciclica, che è quella infettante per l'ospite mammifero.

Che i flebotomi siano responsabili della trasmissione di *Leishmania* attraverso la puntura è noto già all'inizio del XX secolo grazie a Saul Adler, Oscar Theodor, Henry Short e altri (Molyneux, 1987) ma solo recentemente è stato chiarito il meccanismo di trasmissione dei promastigoti dall'intestino dell'insetto alla cute del mammifero. È stato dimostrato che il parassita causa un vero e proprio blocco nell'intestino del vettore che obbliga il flebotomo a espellere attivamente i promastigoti con il rigurgito. Determinante è stata la scoperta che la misteriosa sostanza gelatinosa riscontrata da molti autori nelle femmine di flebotomo infette è di origine

parassitaria (Stierhof et al., 1999). Il gel in questione chiamato appunto PSG (parassitary secretory gel) ed è costituito principalmente da una glicoproteina ad alto peso molecolare chiamata proteofosfoglicano filamentoso (fPPG; Iig et al., 1996). Il fPPG è in grado di gelificare e formare una sorta di stantuffo che ostruisce e distende la parte anteriore dell'intestino medio e si estende attraverso il cardia nell'intestino anteriore. Impacchettati in questo gel ci sono i corpi cellulari dei promastigoti la cui maggioranza sono leptomonadi, i responsabili della secrezione del PSG. I promastigoti metaciclici si trovano concentrati nel polo anteriore, in posizione favorevole alla trasmissione e in piccola parte anche liberi nella proboscide. Gli aptomonadi invece creano un'ulteriore ostruzione fisica e probabilmente forniscono lo scheletro per la costruzione dello stantuffo di gel. Probabilmente con le loro chitinasi gli aptomonadi sono anche responsabili delle lesioni che si riscontrano a livello della cuticola della valvola stomoidale riportate da alcuni autori (Schlein et al., 1992) che ne compromettono la funzionalità favorendo il passaggio dei promastigoti dall'intestino all'apparato buccale Fig.5.

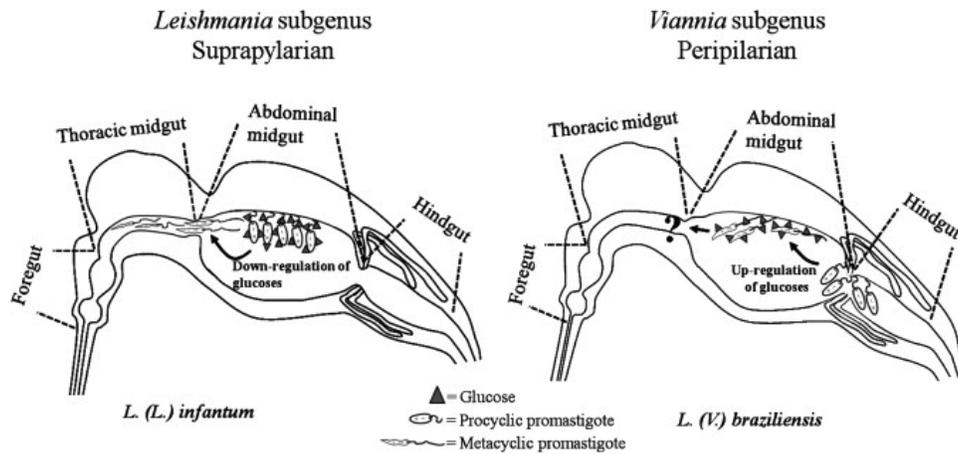


Fig.5: Localizzazione dei promastigoti nell'insetto vettore: da Bates, 2007

La fase di maturazione del protozoo nell'insetto dura all'incirca una o due settimane durante la quale il flebotomo, a seconda della specie, può effettuare o meno ulteriori pasti di sangue. La maggior parte dei parassiti comunque riesce a maturare nella forma infettante di promastigoti metaciclici nel tempo di un singolo ciclo digestivo ed essere espulsi (egesti) attivamente dal flebotomo che si accinge al successivo pasto di sangue. Il PSG deve essere infatti espulso, totalmente o in parte, dalla faringe del flebotomo per creare una via attraverso la quale il sangue possa entrare e questa esigenza crea una condizione estremamente favorevole per il protozoo, le cui forme infettanti sono espulse simultaneamente nella cute del mammifero. Questa osservazione ci permette di constatare che ci sono

almeno tre componenti conosciute nell'inoculum infettante: i promastigoti metaciclici, essenziali per la trasmissione, la saliva del flebotomo e il PSG. La saliva è necessaria per l'alimentazione dell'insetto viste le proprietà vasodilatatorie e antiemostatiche ed è anche stato dimostrato essere in grado di modulare localmente l'immunità in favore della sopravvivenza e replicazione di *Leishmania* (Rohousova and Volf, 2006). Il PSG è anch'esso coinvolto nell'esacerbazione della malattia promuovendo un aumento della patogenesi e del numero dei parassiti quando viene inoculato assieme a promastigoti metaciclici (Rogers et al., 2004) Fig.6.

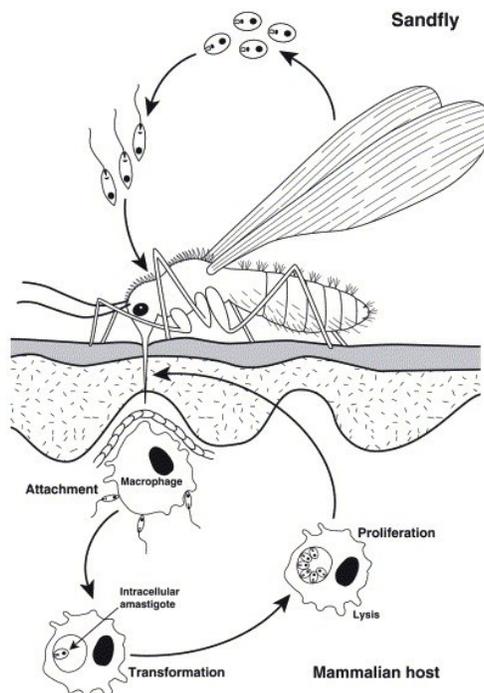


Fig. 6: Ciclo di trasmissione di *Leishmania* dall'ospite invertebrato all'ospite mammifero

1.4 La vita nel vacuolo: aspetti metabolici

1.5.1 L'ambiente del vacuolo parassitoforo

Una volta trasmessi i promastigoti metaciclici sono rapidamente sequestrati dall'ambiente extracellulare dalle cellule mononucleate tramite fagocitosi. I promastigoti di *Leishmania* passano quindi da un ambiente relativamente benigno quale l'intestino del parassita, in cui si moltiplicano immersi nel suo contenuto zuccherino di origine vegetale (Schlein 1986; Gontijo 1998), al vacuolo parassitoforo, ambiente fortemente acido e ricco di idrolasi. Il vacuolo rappresenta un ambiente privilegiato, accessibile a *Leishmania* per via degli adattamenti fisiologici che gli permettono di avvantaggiarsi dei nutrienti a basso peso molecolare derivanti dai processi idrolitici. *Leishmania* entra in contatto con la superficie delle cellule mononucleate attraverso diversi recettori (CR3, CR1, FC-YR) e viene internalizzato attraverso un meccanismo di fagocitosi convenzionale (Antoine et al., 2004). Il vacuolo, che si forma inizialmente intorno al parassita ingerito, è delimitato dalla membrana plasmatica del macrofago, che matura attraverso un processo strettamente regolato di fusione e fissione con endosomi e lisosomi e dà origine ad un vacuolo parassitoforo (PV) acido caratterizzato dai marker del fagolisosoma maturo (Antoine et al., 2004). Alcune specie di

Leishmania (*L. major*, *L. donovani*; Lahav et al., 2001) allo stadio di promastigote sono in grado di rallentare il processo di fusione e la conseguente maturazione del fagolisosoma per concedersi il tempo di maturare allo stadio di amastigote ben più adatto a sopravvivere nel PV. Nonostante queste modificazioni nella genesi l'ambiente del PV rimane acido, con valori di pH intorno a 5.0, e ricco di idrolasi. Gli amastigoti mantengono un pH intracellulare intorno a 7.0 anche se esposti a pH ambientali molto bassi, fino a 4.0 (Glaser et al., 1988). Questa condizione di omeostasi del pH intracellulare viene compromessa dagli inibitori dell'ATPasi e dai buffer privi di glucosio, indicando che il mantenimento di questo altissimo gradiente trans-membrana di pH è un processo che richiede energia. In questi processi sono coinvolti trasportatori attivi di cationi legati ad ATPasi i cui geni sono sovra-espressi negli amastigoti (Meade et al., 1989), e pompe protoniche che sono in grado di mantenere un gradiente di concentrazione di H⁺ di diversi ordini di grandezza attraverso la membrana plasmatica. In alcuni tipi cellulari il glicocalice è in grado di tamponare il pH circostante la membrana, ma questo non sembra il caso di *Leishmania*: negli amastigoti il glicocalice è molto sottile rispetto agli altri stadi vitali, costituito di glicoinositolo fosfolipidi e glicosfingolipidi sottratti all'ospite. Il glicocalice quindi non sembra in grado di condizionare in alcun

modo l'alta concentrazione di protoni attorno alla membrana, a cui contribuisce il parassita stesso eliminandoli dal comparto intracellulare verso la superficie della membrana plasmatica.

Il PV maturo continua a fondersi con endosomi, autolisosomi (Russel et al., 1992; Veras et al., 1995) e riceve traffico o si fonde con vescicole provenienti dal reticolo endoplasmatico (ER) dimostandosi un organello estremamente dinamico che riceve continuamente nuovi contenuti luminali e di membrana dal sistema autolisosomale e secretorio. La presenza di nutrienti nel contesto del vacuolo parassitoforo è determinata dall'ingresso di macromolecole dell'ospite, dall'attività delle diverse idrolasi, dall'afflusso e dall'efflusso di nutrienti a basso peso molecolare attraverso la membrana del PV. Come gli altri comparti del sistema endosomale il PV rappresenta uno dei siti principali della degradazione delle macromolecole e del riciclo dei loro prodotti, e di conseguenza il suo è un ambiente ricco di amminoacidi e lipidi quali fonti di carbonio ma anche nucleosidi, fosfato libero, solfati e numerosi altri nutrimenti tranne il glucosio, la cui disponibilità è scarsa (Eisenreich et al., 2010). *Leishmania* può anche aumentare la permissività del compartimento in cui vive sovvertendo le proprietà fusogeniche del vacuolo verso il ER o altri compartimenti meno lisogeni oppure generando vacuoli più ampi (*L. mexicana complex*), in cui è

facile diluire e attenuare l'insulto ossidativo dell'ospite, e ancora influenzare le vie segnale del macrofago in modo da contenere la risposta antimicrobica ad aumentare invece la propria disponibilità di nutrienti essenziali. Anche la condizione idrolitica del PV può venire influenzata dal parassita con la sintesi e il rilascio di cistein proteasi che ne aumentano il potere degradativo e la disponibilità di nutrienti.

1.5.2 Caratteristiche metaboliche degli amastigoti

Lo studio degli amastigoti di *Leishmania*, che è lo stadio di interesse medico, è una acquisizione recente conseguente allo sviluppo di tecniche che ne permettono la coltivazione in vitro. Colture axeniche di amastigoti si possono ottenere partendo da promastigoti in fase stazionaria esposti ad temperature elevate da 33° a 37° e a bassi valori di pH, condizioni che mimano la vita nell'ospite mammifero.

L'amastigote deve acquisire tutti i nutrienti dal PV e per questo possiede un vasto assortimento di trasportatori e recettori per l'endocitosi che competono con gli equivalenti dell'ospite sulla membrana del fagosoma e che funzionano nella direzione dell'efflusso. Per avvantaggiarsi sull'ospite gli amastigoti utilizzano un sistema di carriers che funzionano come co-trasportatori di protoni che sfruttano il pH acido come fonte di energia per

il trasporto attivo, anche contro gradiente di concentrazione. Negli amastigoti sono stati caratterizzati trasportatori per zuccheri, amminoacidi, poliammide, ribosio, biopterina e inositolo. Anche l'endocitosi, ristretta alla tasca flagellare contribuisce sicuramente all'acquisizione di nutrienti (Burchmore and Barret, 2001).

Leishmania è in grado di utilizzare diverse fonti di carbonio (zuccheri, lipidi e amminoacidi) e, come già accennato, possiede un complesso sistema di trasporto e recupero dei numerosi metaboliti che non è in grado di sintetizzare de novo. I primi cinque enzimi legati alla glicolisi, in *Leishmania* come negli altri tripanosomatidi, si trovano compartimentalizzati assieme a molti altri enzimi nei glicosomi (Saunders et al. 2010; 2011). Entrambi gli stadi di *Leishmania* utilizzano preferibilmente il glucosio e gli altri zuccheri nelle colture in vitro, non si sa però in quale misura questo dato si possa estendere alla vita intracellulare considerando che la sopravvivenza a questo stadio dipende strettamente dalla gluconeogenesi (Naderer et al., 2006). Il catabolismo degli esosi è essenziale per lo sviluppo nel macrofago e qualsiasi difetto nei sistemi della loro acquisizione o metabolismo compromettono la crescita in vivo di *Leishmania*. Queste specie, oltre al glucosio sono in grado di catabolizzare un certo numero di zuccheri compreso galattosio e mannosio (Lamerz et al.,

2010) e glucosammine. Queste ultime sono i carboidrati più abbondanti nel PV (Naderer et al., 2010) e derivano dalla internalizzazione e degradazione dei glicogossaminoglicani e dei proteoglicani della matrice extracellulare da parte dei macrofagi (Jiang et al., 2007). Gli amastigoti contribuiscono alla degradazione dei GAG tramite la secrezione di chitinasi. Per sostenere il proprio metabolismo in una nicchia povera di glucidi gli amastigoti sintetizzano una riserva di carboidrati: il mannogeno. Questa molecola di riserva accumulata nel citoplasma è unica nel suo genere, sintetizzata a partire da residui mannosio uniti da legami β 1-2 in corte catene (Ralton et al., 2003). Entrambe le forme di *Leishmania* sono capaci di utilizzare gli amminoacidi come fonte alternativa di carbonio oltre gli esosi, inoltre possiedono diversi enzimi implicati nella gluconeogenesi la cui espressione rappresenta fattore di restrizione nella vita intracellulare. I peptidi e gli amminoacidi derivanti dall'idrolisi proteica all'interno del PV costituiscono una fonte di carbonio ovvia per i promastigoti. Il genoma di *Leishmania* possiede numerosi geni putativi per le amminoacido permeasi così come un vasto repertorio di idrolasi lisosomiali che vengono secrete per condizionare l'ambiente del PV ed aumentarne il potenziale degradativo. Anche gli acidi grassi sono utilizzati quali fonte alternativa di carbonio da molti patogeni intracellulari tra cui *Leishmania*. La β -ossidazione degli acidi grassi mette a

disposizione acetyl-CoA per la respirazione mitocondriale. Questa via metabolica è attiva anche nei promastigoti ma subisce un forte incremento negli amastigoti (Blum, 1990; Hart et al., 1982), in particolare negli amastigoti di *L. major* e donovani è stata dimostrata una sovra-espressione degli enzimi coinvolti nella β -ossidazione. *Leishmania* manca però degli enzimi del ciclo del glicossilato, che permettono la gluconeogenesi a partire dall'acetyl-CoA, e per questo motivo i lipidi non possono essere usati come fonte unica di carbonio (Naderer et al., 2010). L'acquisizione dei lipidi da parte degli amastigoti avviene principalmente tramite le lipoproteine internalizzate e degradate dal macrofago infetto (Samanovic et al., 2009). Un'altra forma interessante di acquisizione di lipidi avviene anche tra zone di adesione tra la membrana dell'amastigote e la membrana vacuolare: i glicosfingolipidi dell'ospite vengono intercalati nel sottile glicocalice che riveste la membrana plasmatica di questo stadio mentre le sfingomieline, vengono internalizzate e metabolizzate a livello mitocondriale per costituire tipici lipidi parassitari quali la lipofosfoceramide (Zhang et al., 2009). La disponibilità di ferro ha un ruolo centrale nella sopravvivenza di *Leishmania* nel PV. Gli amastigoti sanno usare il ferro ferroso (Fe^{2+}) così come l'emina (Fe^{3+} prodotto dell'ossidazione del ferro dell'eme) e l'emoglobina e inoltre un recettore ad alta affinità per l'emina è stato descritto recentemente

in *L. infantum* (Carvalho et al., 2009). Nel topo e nel cane i geni *Slc11a1* (anche chiamati *Nramp 1* o *Lsh*) codificano per delle pompe fagosomali a efflusso che traslocano il ferro e il magnesio divalente nel citosol sottraendolo alla disponibilità del parassita. Come contromisura *Leishmania* è in grado di sovraesprimere il proprio trasportatore del ferro, *LIT1* dopo il suo ingresso nel macrofago (Huynh et al., 2008). In recenti studi condotti su *L. donovani* hanno dimostrato che la deplezione del ferro da parte del parassita determina l'attivazione dei sensori del ferro *IRP1* e *IRP2* che indirettamente aumentano la produzione di transferrina e l'acquisizione di ferro tramite questa molecola (Das et al., 2009). Altra molecola implicata nella sopravvivenza intracellulare di *Leishmania* e di altri tripanosomatidi è il trypanotione che viene sintetizzato dagli amastigoti a partire da due molecole di glutatione unite da spermidina (Dumas et al. 1997). Questa molecola è implicata nella neutralizzazione dell'attacco ossidativo e nitrosativo a cui gli amastigoti sono esposti in conseguenza dell'attivazione microbica del macrofago (Dumas et al., 1997). Il trypanotione e il glutatione subiscono un continuo turnover e il mantenimento degli adeguati livelli cellulari necessita l'acquisizione o la sintesi degli aminoacidi precursori (Wyllie et al., 2004), tra cui l'arginina, che rappresenta alla pari del ferro un nutriente essenziale per la sopravvivenza del parassita.

Gli amastigoti sono dipendenti dal metabolismo mitocondriale per l'energia e per i metaboliti, come dimostrato dalla loro sensibilità all'ergosterolo (Altmann et al., 2005) ed all'istatina 5, un peptide antimicrobico umano che interferisce con la sintesi dell'ATP (Zhang et al., 2009). La disfunzione mitocondriale porta ad uno stress ossidativo dovuto alla mancanza di elettroni dalla catena respiratoria, ma anche probabilmente a difetti nella divisione cellulare, essendo questo organello fisicamente ancorato al corpo basale. Gli amastigoti devono recuperare anche le purine dal PV, e lo fanno tramite numerosi trasportatori e proteine di membrana la cui espressione viene modulata in risposta alla disponibilità del ligando (Boiz et al., 2010). Nonostante questa osservazione dimostri una flessibilità genomica e adattabilità alla scarsità di nutrienti degli amastigoti in vivo, l'espressione della maggior parte dei trasportatori ad eccezione dei trasportatori del ferro LitA, rimane costante o significativamente diminuita nel passaggio da promastigote alla vita intracellulare. Questo è conforme al fatto che gli amastigoti entrano in una fase di quiescenza metabolica o/e che il livello di molti nutrienti nel fagosoma sia sufficiente per lo sviluppo. La modulazione genica che accompagna lo sviluppo dell'amastigote riguarda principalmente l'espressione di enzimi chiave del metabolismo del carbonio (Paape et al., 2008; Rosenzweig et al., 2008) ed è troppo modesta da giustificare

l'adattamento ai grandi cambiamenti imposti dalla vita intracellulare. Le modificazioni metaboliche degli amastigoti di *Leishmania* in risposta alle esigenze ambientali è basato principalmente su modificazioni post-traduzionali degli enzimi e la fosforilazione probabilmente è la chiave di queste modificazioni (Naderer et al., 2011; Wiese, 2007). Modificazioni del fosfoproteoma di *L. donovani* sono state dimostrate in risposta all'aumento della temperatura e alla restrizione dei nutrienti (Morales et al., 2010).

Capitolo 2

Immunologia dell'infezione da Leishmania

2.1 Interfaccia macrofago-*Leishmania*: l'immunità innata

2.1.1 Ingresso

Prima di essere internalizzati dalle cellule dell'ospite i promastigoti metaciclici devono evadere la lisi mediata del sistema complemento del mammifero. Le molecole di LPG sono in grado di difendere i promastigoti metaciclici da questo tipo di offesa (Puentes et al., 1990; Spath et al., 2003) mentre è dimostrato che le forme procicliche sono altamente suscettibili alla lisi complemento-mediata (Puentes et al., 1989). La differenza è dovuta alla lunghezza dei polimeri di PG nel LPG delle forme metacicliche, che possiedono almeno il doppio delle unità ripetute rispetto alle forme procicliche. Questo previene l'attacco del membrane attack complex (MAC) del complemento e la formazione di pori sulla superficie della membrana parassitaria (Puentes et al., 1989). Lo scatenarsi delle fasi iniziali della cascata del complemento possono contribuire invece all'ingresso di *Leishmania* nei macrofagi sfruttando i recettori del complemento. Il LPG assieme alla proteasi gp63 sono in grado di attivare il complemento portando

alla formazione delle opsonine C3b e C3bi che si legano alla superficie di *Leishmania* da una parte e ai recettori CR1 e CR3 dall'altra mediando l'internalizzazione. La fagocitosi via CR1 e CR3 è considerata un mezzo di ingresso "silenzioso" perché non scatena lo scoppio ossidativo e ostacola la produzione dell'IL-12 (Mosser and Edelson, 1987; Wright and Silverstein, 1983). Oltre a ai recettori appena descritti, esistono altre molecole di superficie interessate nella fagocitosi dei promastigoti, in un sistema tipicamente ridondante che garantisce una rapida internalizzazione da parte dei macrofagi. Il LPG infatti è capace di legare il recettore per il mannosio-fucosio espresso dai macrofagi (Moore et al., 1993) e la proteina C-reattiva (CRP) che è in grado di mediare la fagocitosi e attivare il macrofago con la conseguente secrezione delle citochine pro-infiammatorie (McNeely et al. 1989). Il mannan binding protein (MBP) riconosce i residui di mannosio sul LPG e permetterla formazione della C3 convertasi e la generazione della C3b che, come è già stato descritto, funziona da opsonina.

2.1.2 Alterazioni del fagosoma

Dopo la fagocitosi i promastigoti si trovano racchiusi nel fagosoma che va incontro a numerosi processi di fusione che esitano nella genesi di un fagolisosoma, chiamato vacuolo parassitoforo (PV). Durante questo processo il LPG in alcune specie (*L. donovani* e *L. major*) è responsabile di un ritardo nella fusione coi lisosomi rimandando il processo di acidificazione del PV e facendo guadagnare tempo al promastigote che muta nella forma ben più acidofila dell'amastigote (Spath et al., 2003). È stato dimostrato comunque che i promastigoti sono in grado di sopravvivere alla fusione precoce coi lisosomi anche perché il LPG di per sé è in grado di contrastare l'azione degli ossidanti (Holm et al. 2001). Il ritardo nella fusione ha un significato più ampio, infatti il cambiamento delle caratteristiche di membrana risulta in una delocalizzazione dello scoppio ossidativo dalla sua normale locazione perivacuolare. Questi fenomeni di alterazione nella fusione probabilmente hanno conseguenze anche nel fenomeno di riconoscimento immune e processazione dell'antigene che dipendono dai processi idrolitici dell'ospite (Desjardins and Descoteaux, 1997). È interessante riportare che le specie appartenenti a *L. mexicana* complex non sono in grado di ritardare la fusione del PV con i lisosomi, ma favoriscono la fusione dei fagosomi fra loro creando un PV di grandi

dimensioni all'interno del quale le molecole dell'insulto ossidativo vengono diluite (Antoine et al., 2004).

2.1.3 Alterazione delle cascate di attivazione

I monociti e i macrofagi sono cellule dell'immunità innata e rappresentano la prima linea di difesa della risposta immunitaria contro l'invasione esterna. Partecipano anche all'avvio delle risposta immunitaria acquisita attraverso l'internalizzazione di particelle estranee che vengono processate ed esposte sulla superficie associate al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Nello stato inattivato i macrofagi sono relativamente quiescenti, mostrando bassi livelli di consumo dell'ossigeno, di espressione dei geni MHC classe II e secrezione di citochine. Nello stato attivato invece diventano cellule potenzialmente microbicide. In risposta a molecole quali interferon- γ (IFN- γ), dal tumor necrosis factor- α (TNF- α) i macrofagi esprimono alti livelli di inducibile nitrogen oxide sintetase (iNOS) che comporta la sintesi di ossido nitrico (NO) nelle specie NO₂⁻ e NO₃⁻ (MacMicking et al., 1997) a partire dall'amminoacido L-arginina. Questi prodotti intermedi dell'azoto oltre all'azione microbicide coordinano un processo che porta alla deprivazione del ferro, fattore restrittivo per lo sviluppo del parassita. Assieme all'azoto reattivo il macrofago attivato produce peptidi antimicrobici e intermedi

dell'ossigeno (ROS) quali perossido d'idrogeno, ione superossido e idrossi radicali che reagiscono con le membrane fosfolipidiche dei patogeni danneggiandole. Lo scoppio ossidativo e la produzione di NO sono regolati da eventi fosforilativi mediati dalla protein kinasi C (PKC).

I glicoconjugati espressi dai protozoi sono in grado di attivare i macrofagi tramite i recettori dell'immunità innata con la conseguente secrezione di citochine quali IL-12 e TNF- α e la sintesi di iNOS. L'attivazione dei toll-like receptors (TLRs) da parte di ligandi di origine microbica reclutano la proteina adaptor MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) e innescano una serie di eventi segnale intracellulari che culminano nell'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B e la sua traslocazione nel nucleo. NF- κ B induce meccanismi dell'immunità innata quali la sintesi di azoto e ossigeno attivi, la secrezione di citochine e chemochine (Abu-Dayyeh et al. 2008). Il LPG di *Leishmania* in particolare è in grado di legare il TLR2 di macrofagi e cellule Natural Killer (NK) e attivare la traslocazione di NF- κ B. Nei macrofagi umani e murini l'attivazione di NF- κ B comporta la secrezione di citochine tipo Th1 (IL-12 in particolare), ROS e NO mentre nelle cellule NK scatena l'overespressione dello stesso TLR2, dell' IFN- γ e del TNF- α . Tutte queste molecole stimolano l'attività microbica del macrofago e in seguito alla presentazione dell'antigene indirizzano la

risposta adattativa nel senso citotossico che è risolutivo nell'eliminazione delle leishmanie. Altri studi hanno dimostrato il contrario suggerendo che l'uso di differenti tipi di macrofagi abbia contribuito a questi risultati contraddittori e sottolinea l'importanza del genotipo dell'ospite nella formulazione della risposta all'infezione (Feng et al., 1999). Recentemente è stato anche dimostrato che attivando i macrofagi con IFN- γ viene stimolata l'espressione di TLR3 che sono riconosciuti da *Leishmania* e portano all'espressione di citochine pro-infiammatorie quali TNF- α e NO. I TLR3, che riconoscono come ligando RNA a doppio filamento, sono attivati dal *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1). Questo virus è stato isolato in *L. guyanensis* e la sua presenza sembra amplificare la virulenza del parassita (Hartley et al., 2012).

Leishmania ha sviluppato l'abilità di replicare all'interno degli stessi macrofagi reclutati per distruggerla. La perdita della capacità microbicida e di attivazione delle cellule dell'immunità acquisita da parte dei macrofagi sono la conseguenza dell'interferenza del parassita con le vie di segnalazione della cellula ospite. Le strategie che *Leishmania* usa per inattivare i macrofagi sono sia di inibizione delle proteine coinvolte nel processo di attivazione dell'immunità, sia di attivazione delle molecole che regolano in senso negativo la funzione immunitaria.

Kinasi -Le protein kinasi mitogen activated (MAPKs) sono un gruppo di kinasi treonina/serina specifiche coinvolte in importanti vie di segnalazione in cellule eucariotiche. Le MAPKs regolano nei macrofagi l'attivazione della produzione di citochine pro infiammatorie e NO (Seger, 1995) e nella loro famiglia sono incluse le kinasi legate a segnale extracellulare 1 e 2 (extracellular signal-related kinase, ERK1/2), c-jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK. L'attivazione di queste kinasi richiede una doppia fosforilazione nei residui serina/treonina e tirosina dai domini regolatori da parte di MAP/ERK kinasi (MEK) a loro volta attivate da MEK kinasi (MEKK) (Seger et al., 1995, Cobb, 1999). Una volta attivate queste kinasi fosforilano un certo numero di proteine intracellulari tra le quali il fattore di attivazione 1 (AP-1), nuclear factor κ B (NF- κ B) e gli interferon regulatory factors (IRFs) che si attivano e a loro volta guidando l'espressione genica per la secrezione di citochine e NO. *Leishmania* è in grado di inibire questo meccanismo inducendo un' aumento intracellulare di fosfotirosin fosfatasi (PTP; Nandan et al., 1999) che defosforilano le MAPK disattivandole e bloccando la cascata di trascrizione successiva. Un altro possibile meccanismo di disattivazione delle MAPK può essere spiegato con l'aumento del ceramide endogeno indotto da *Leishmania* nei macrofagi

infetti (Gosh et al., 2001). Il ceramide è un lipide endogeno che funge da mediatore nella regolazione di diverse risposte quali l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi e la senescenza cellulare (Hannun, 1996). Il ceramide è stato scoperto capace di defosforilare ERK tramite tirosin fosfatasi con una conseguente attenuazione della transattivazione di AP-1 e NF- κ B e della produzione di NO (Gosh et al., 2001). Un altro meccanismo di inattivazione suggerito da alcuni autori è la degradazione di queste kinasi da parte della cistein proteinasi secrete dal parassita (Cameron et al., 2004).

Alcune specie di *Leishmania*, al contrario, modulano in senso positivo l'espressione di ERK1/2 che è legata alla produzione di IL-10, citochina antinfiammatoria che favorisce la persistenza del parassita nei tessuti (Mathur et al., 2004). Anche le vie regolate tramite MAPK p38 si sono dimostrate importanti per il controllo dell'infezione da *Leishmania*, ad esempio il trattamento di macrofagi con anisomicina un attivatore della p38 porta ad una diminuzione della sopravvivenza degli amastigoti nel macrofago (Junghae, 1996), dato consistente col fatto che il testosterone, inibente l'attivazione della p38 favorisce la sopravvivenza del parassita (Lui et al., 2006).

Le protein kinasi C (PKC) sono una famiglia di serin/treonina kinasi attivate dal calcio e da fosfolipidi che mediano vie di segnalazione importanti

alterate da *Leishmania* per evadere le attività microbicide del macrofago. Le PKC sono suddivise in tre sottofamiglie secondo la distribuzione intracellulare, il tipo di cofattore richiesto e la specificità del substrato in PKC classiche (cPKC α, β, γ), nuove (nPKC $\epsilon, \delta, \eta, \theta$) e atipiche (aPKC ζ, ι, λ) (Martelli et al., 2003). Queste kinasi sono attivate da secondi messaggeri intracellulari quali Ca^{2+} e diacilglicerolo (DAG) assieme alla fosfatidilserina nelle forme classiche, DAG e fosfatidilserina nelle forme nuove mentre le atipiche pare vengano attivate dalla fosfatidilserina. Nella conformazione inattiva le PKC risiedono nel citoplasma e dopo attivazione da parte di ormoni o esteri del forbolo traslocano sulla membrana o altri organelli cellulari (Newton, 1997). *Leishmania* ha evoluto meccanismi inibitori PKC specifici ed è dimostrato che il LPG e il GIPL (44) degli amastigoti e dei promastigoti *L. donovani* sono in grado di inibire l'espressione genica c-fos mediata da PKC (Moore, 1993). Il semplice contatto di *Leishmania* con la superficie macrofagica comporta l'attivazione di PKC e la produzione di O_2 e NO mentre l'internalizzazione di questi parassiti inibisce questa stessa risposta (Bhunia, 1996). Una volta internalizzati infatti la produzione di sostanze microbicide quali O_2 e NO viene spenta parzialmente a causa dell'interferenza coi meccanismi di attivazioni regolati da PKC. Il LPG sembra infatti capace di legare e sequestrare direttamente molecole

regolatrici quali Ca^{2+} e DAG (Descoteaux, 1992) alle PKC. Il LPG, come già accennato è responsabile del ritardo nella maturazione del PV, e lo fa bloccando il processo PKC- α dipendente della depolimerizzazione della F-actina (Holm et al., 2003). Legato almeno in parte alla disfunzione delle PKC è anche la produzione di prostaglandina E2 (PGE2) che è una molecola immunosoppressiva secreta dai macrofagi in grado di condizionare le cellule circostanti non infette e renderle più accessibili all'infezione del parassita (Reiner, 1984; Farrell, 1987). La chelazione del Ca^{2+} corrisponde all'inattivazione delle PKC calcio-dipendenti legate all'incremento delle capacità microbicide del macrofago e contemporaneamente e all'attivazione delle PKC atipiche calcio- indipendenti , in particolare PKC- ζ che modula in senso negativo la produzione di NO e TNF- α . L'attivazione di PKC- ζ è indotta anche da IL-10, una citochina antinfiammatoria classicamente pro-Th2 (Bhattacharyya et al, 2001).

Come già menzionato l' IFN- γ induce l'attivazione del macrofago ed è implicato nella resistenza all'infezione di *Leishmania*. Le funzioni biologiche di questa molecola si espletano tramite un recettore multisubunità chiamato appunto IFN- γ receptor (IFN- γ R). L' IFN- γ R attivato dal ligando dimerizza e permette la trans-fosforilazione delle kinasi associate al recettore: le janus kinasi (JAK1/JAK2). Le JAK a loro volta fosforilano la

coda citoplasmatica del recettore stesso, che recluta le molecole del fattore di trascrizione STAT-1 α in sede citoplasmatica. Il fattore di trascrizione viene quindi fosforilato e diventa un omodimero che migra nel nucleo e promuove la trascrizione dei geni IFN- γ -indotti. La disfunzione del macrofago infetto in risposta al IFN- γ sembra dovuto sia ad un aumento della degradazione della STAT-1 a livello del proteasoma (Forget et al., 2005) che ad un aumento intracitoplasmatico delle PTP che interagiscono con le JAK, inattivandole (Blanchette et al, 1999).

Fosfatasi-Le fosfotirosin fosfatasi (PTP) sono enzimi capaci di idrolizzare i legami fosfoestere su residui di tirosina, ma anche di serina/treonina. La defosforilazione mediata dalle PTP è critico per la regolazione di numerose funzioni cellulari e sono sfruttate proficuamente da *Leishmania* per inibire le cascate di attivazione dell'ospite. Due proteine secrete dagli amastigoti la cistein proteasi B (CPB) e la gp63 sono in grado di attivare in maniera proteolitica le PTP che inattivano i fattori di trascrizione dell'ospite in risposta all'IFN- γ ; in particolare la protein tirosin fosfatasi contenente l'omologia Src 2 (PTP SHP) è l'enzima implicato nel silenziamento del IFN- γ e lo stesso enzima è in grado di legare una kinasi critica (IRAK-1)

coinvolta nelle cascate segnale dei TLR. Il legame avviene attraverso un motivo conservato ITIM-like presente in molte kinasi legate alla segnalazione via TLR suggerendo un meccanismo di regolazione che coinvolge non solo IRAK-1 (Abu-Dayyeh, 2008). Gli inibitori delle PTP quali componenti del bis- perossivanadio (bpV-phen) si sono dimostrati d'aiuto nel controllo dell'infezione da *Leishmania* nel topo (Matte et al., 2000).

2.1.4 Altrazione della presentazione dell'antigene e reinfezione

Fase essenziale per la diffusione di *Leishmania* e la progressione della malattia è la possibilità di reinfettare nuovi macrofagi. Per fronteggiare questa esigenza *Leishmania* è in grado di sovvertire l'espressione di recettori e chemochine del macrofago e di interferire nel meccanismo di presentazione dell'antigene. I macrofagi infetti da *L. major* ad esempio incrementano l'espressione di numerose chemochine delle quali la stragrande maggioranza sono chemoattrattivi monocitari che richiamano i macrofagi dell'ospite nei tessuti infetti favorendo la diffusione del parassita. Di queste molecole solo una chemochina, la MIP-1 richiama i neutrofili, cellule estremamente efficienti nell'eliminazione di *Leishmania* (Forget et al.,

2001). Nonostante l'invasione di nuovi macrofagi sia favorita dalla co-espressione di molecole immunosoppressive quali PGE2 che tendono a mantenere areattive le nuove reclute macrofagiche, l'utilizzo di chemochine rappresenta sempre un'arma a doppio taglio. Gli ROI e NO sono una fonte di pericolo che si ripresenta ad ogni nuovo ingresso nella cellula ospite e che il parassita contrasta con mettendo in atto varie strategie, alcune delle quali sono già state descritte. In particolare l'NO sembra essere il più importante fattore microbicida che si è rivelato in grado di distruggere gli amastigoti anche in sospensioni acellulari (Liew et al., 1990). Gli amastigoti oltre che con la modulazione del sistema kinasi/fosfatasi sono in grado di inibire la produzione di NO tramite la sovra espressione di arginasi e altre poliamminasi che convertono l'arginina, precursore della sintesi NO in ornitina ed urea (Osorio et al., 2009). I ROI, anche se importanti, sembrano avere un ruolo precoce e solo transitorio.

Il ruolo della presentazione dell'antigene da parte del macrofago è centrale per l'attivazione dell'immunità innata, e *Leishmania* interviene per sovvertire questo meccanismo con diverse tattiche. Una di queste consiste nell'interferire con l'espressione di MHC classe II sulla superficie dei macrofagi infetti. Alcuni studi fatti su *L.amazonensis* e *L.donovani* dimostrano che nei macrofagi infetti la fagocitosi, la processazione dell'antigene e la

produzione di MHC II avviene normalmente ma queste cellule mancano di presentare l'antigene associato alle molecole MHC II (Prina et al., 1993; Fruth et al., 1993). Probabilmente la mancata presentazione dell'antigene deriva dal fallimento nella fase di caricamento dell'antigene sulla molecola MHC II, dovuto all'abilità del parassita di sovvertire il traffico vescicolare dell'ospite. Le vescicole contenenti le molecole MHC II vengono inoltre deviate verso il PV e poi internalizzate dai parassiti che le degradano attraverso le proprie cistein proteasi (De Souza Leao et al., 1995). L'attivazione dei linfociti T CD4+ è un meccanismo a doppio segnale che richiede il legame del T-cell receptor (TCR) al complesso antigene-MHC II sulla superficie della cellula presentante l'antigene assieme al legame delle molecole CD28 o ligando CD40 (CD40L) con le molecole co-stimolatorie dell'APC della classe B7 o CD40. *L. donovani* è in grado di bloccare l'espressione della molecola B7-1 attraverso un meccanismo mediato dalle prostaglandine (Saha et al., 1995); *L. major* inoltre interferisce nel meccanismo di segnalazione del CD40 attraverso la modulazione di MAPK p38 (Feng et al., 1999).

2.2 Altri Ospiti

In generale i macrofagi sono considerati l'ospite di elezione di essendo in grado di ospitare anche più di dieci amastigoti per cellula, altre cellule fagocitarie professionali e non professionali (eosinofili, neutrofilo e fibroblasti) sono in grado di veicolare un numero inferiore di parassiti (De Trez et al. 2009, Muraille et al., 2010). Le cellule dendritiche reclutate da monociti (mo-DC) possono essere le cellule ospiti più abbondanti nelle lesioni infiammatorie nel sito di inoculazione o nei linfonodi che le drenano (De Trez et al. 2009, Muraille et al., 2010). A seguito della risoluzione della malattia clinica i parassiti possono persistere in forma quiescente in popolazioni cellulari quali i fibroblasti che sono fagociti non professionisti (Bogdan et al., 2000). Le specie viscerotropiche (*Leishmania donovani* e *L. infantum/chagasi*) possono disseminare dal derma al fegato, milza e midollo osseo causando la leishmaniosi viscerale. La principale cellula ospite infetta nel fegato è la cellula del Kupffer, i macrofagi residenti marginali e i metallofilo marginali nella milza (Beattie et al., 2010, Murray, 2001). Altre cellule ospite quali neutrofilo ed eosinofili possono ospitare i parassiti. I neutrofilo in particolare sono le cellule ospite meno permissive per la crescita di *Leishmania* si come risultato dell'induzione di una potente risposta

microbicide o/e per una severa restrizione dei nutrienti (Nylen et al., 2007).
 Comunque alcuni promastigoti possono evitare o bloccare la maturazione del fagosoma e sopravvivere in questo compartimento intermedio non litico caratterizzato dai marker del ER (Ndjamen et al., 2010). In questo caso i neutrofili vanno incontro ad apoptosi e vengono a loro volta fagocitati dai macrofagi attraverso un meccanismo mediato da recettori che non innesca la risposta difensiva. I neutrofili in questo caso funzionano come “cavallo di Troia” (Laskayet al., 2003) veicolando al sicuro i promastigoti in quelle cellule dotate di lunga vita dove sono in grado di proliferare e stabilire la malattia: i macrofagi Fig.7.

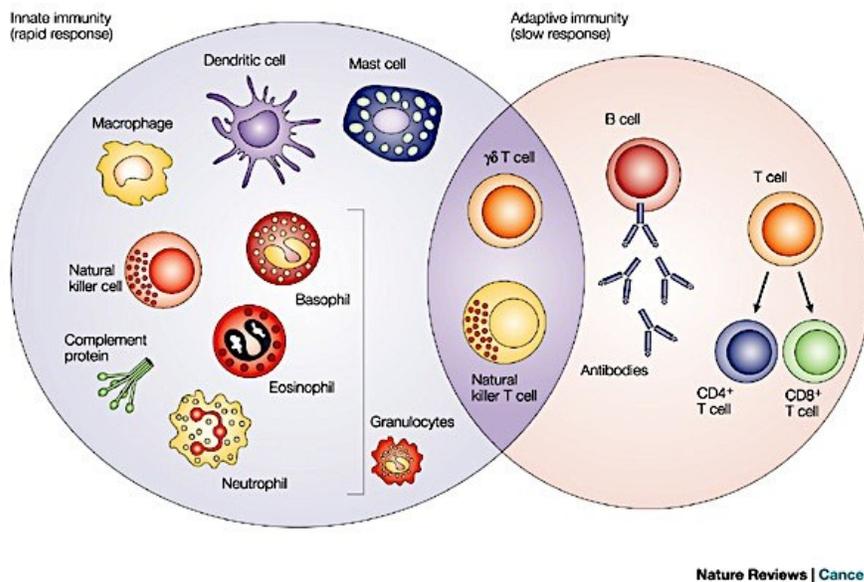


Fig.7: Cellule dell'immunità innata e dell'immunità adattativa: da Dranoff, 2004

2.3 Il macrofago, il linfocita e l'immunità adattativa.

L'immunità protettiva contro i parassiti di *Leishmania* e la produzione di citochine proinfiammatorie si ritiene sia mediato dalla sottopopolazione di linfociti T helper di tipo 1 (Strauss-Ayali et al., 2007). L'attivazione dei linfociti T richiede la presentazione degli antigeni sotto forma di frammenti peptidici degradati e montati sulle molecole MHC classe II assieme ad un segnale di co-stimolazione generato dalle molecole co-stimolatorie (Chambers and Allison, 1997). Il contemporaneo riconoscimento da parte del T cell receptor (TCR) del complesso peptide-MHC II e l'interazione con il recettore B7 (CD80) o B7-2 (CD86) con la molecola co-stimolatoria CD28 risulta nell'attivazione del linfocita T, nella sua proliferazione e differenziazione con la produzione di citochine quali IL-12, IFN- γ e TNF- α (Sperling and Bluestone, 1996), Fig.8.

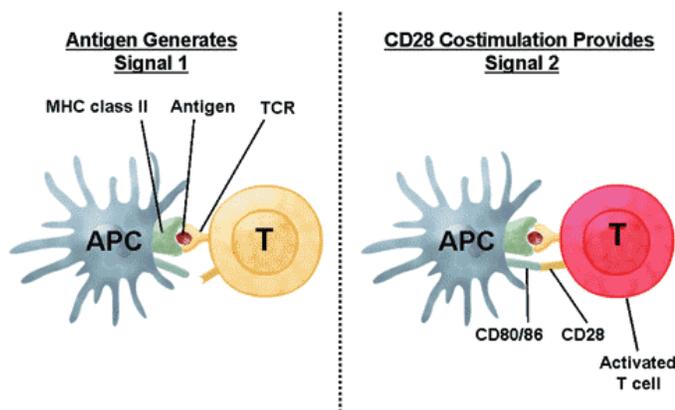


Fig.8: Presentazione dell'antigene da parte delle APCs e attivazione dei linfociti T CD4+: da Schwartz, 2003

In presenza di TNF i macrofagi attivati dall' IFN- γ producono NO che è considerato uno dei principali meccanismi macrofagici per l'eliminazione dei parassiti di *Leishmania* (Pinelli et al., 2000). In assenza del legame col CD28, il linfocita T va incontro ad apoptosi o diventa anergico. D'altro canto il co-legame di B7 con l'antigene 4 del linfocita T citotossico (CTLA-4) risulta in un arresto del ciclo cellulare e l'inattivazione del linfocita (Alegre et al., 2001). Nella leishmaniosi canina la perdita di funzionalità delle cellule T nella tarda fase dell'infezione è da imputare alla mancanza di coordinazione nell'espressione delle molecole costimolatorie B7 e B72 sul macrofago (Pinelli et al., 1999; Antoine et al., 1999). I macrofagi hanno un ruolo primario contro l'invasione dei microorganismi, incluso *Leishmania*. Queste cellule funzionano come cellule presentanti l'antigene (APC) durante l'infezione processando l'antigene ed esponendolo in modo da essere riconosciuto dal linfocita Th, legato alle molecole MHC II. L'insorgere dell'infezione da *Leishmania* dipende dal bilanciamento tra l'abilità dell'ospite di indurre i meccanismi leishmanicidi e le strategie del parassita di interferire nei processi di presentazione dell'antigene e modulare così la risposta immunitaria mediata dai linfociti T (Panaro et al., 2008). Recenti studi in vitro dimostrano che *Leishmania infantum* è in grado di determinare un aumento dell'espressione di molecole MHC II sulla superficie del

macrofago accompagnato significativa diminuzione nell'espressione delle molecole costimolatorie B7 e B7-2 (Diaz et al., 2012). La capacità delle APC di attivare i linfociti T CD4+ naive dipende dalle molecole costimolatorie B7 e B7-2 che legano in modo transitorio il linfocita T alla APC e permettono l'attivazione della cascata segnale che porta alla attivazione della cellula T, Fig.9.

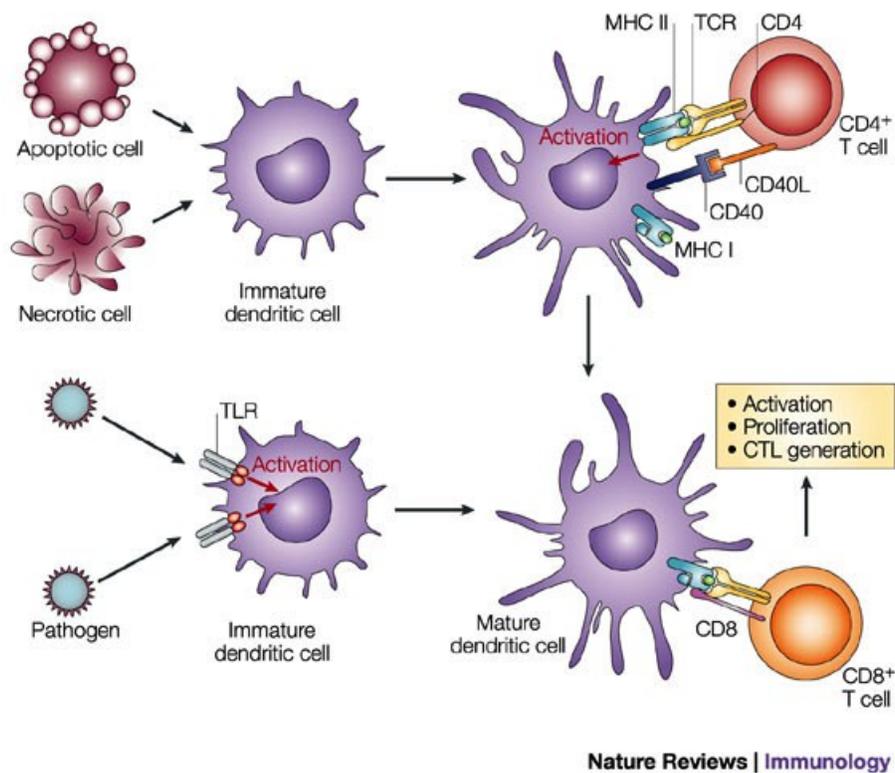


Fig.9: Attivazione dei linfociti T CD4+ e CD8+: da <http://www.nature.com/nri/journal>

In assenza di molecole costimolatorie, al legame del TCR col complesso antigene-MHC II consegue l'inattivazione del linfocita interagente e

l'ingresso in una fase denominata “anergica” oppure vada direttamente incontro ad apoptosi (Alegre et al.,2001). Lo studio di Diaz et. al dimostra inoltre una significativa diminuzione della produzione di NO nei macrofagi infetti che è esacerbata dalla co-coltura con linfociti autologhi. Probabilmente questo fatto è la conseguenza della mancanza del segnale costimolatorio e può indicare anche la produzione di transforming growth factor (TGF)- β e di citochine antiinfiammatorie (IL-4, IL-10, IL-13) dai linfociti effettori co-coltivati con i macrofagi in presenza di parassiti di *Leishmania* o dei loro antigeni. Il profilo citochinico IL-4, IL-13 e la secrezione della citochina antiinfiammatoria IL-10 sono legate allo sviluppo della popolazione linfocitaria Th2 e al fenotipo che sviluppa la malattia.

Questo tipo di citochine sono inoltre legate alla creazione di nicchie tissutali che permettono la persistenza dei parassiti di *Leishmania* anche dopo la risoluzione della malattia clinica. La persistenza dei parassiti promuove da un lato il mantenimento di certo livello di immunità utile a contrastare le reinfezioni, ma che può portare a recrudescenze nel caso di un fallimento nella funzionalità dei linfociti Th, come accade nei casi di infezione con HIV/AIDS.

2.4 L'immunità cellulo-mediata

2.4.1 Popolazioni linfocitarie e citochine nel sangue periferico

Lo sviluppo dei sintomi della malattia nella leishmaniosi canina è sempre associato ad una intensa risposta immune di tipo umorale, al contrario gli animali infetti ma asintomatici hanno sempre bassi titoli di anticorpi anti-*Leishmania*. Questo fatto sottolinea un'associazione fra l'insorgenza dei sintomi e l'incremento dell'attività dei linfociti B che porta alla produzione di alti titoli di anticorpi anti-*Leishmania*. I linfociti B sono le cellule coinvolte nella risposta immunitaria umorale e sono componenti essenziali del sistema immunitario adattativo. I linfociti B sono i precursori delle plasmacellule la cui funzione principale è produrre immunoglobuline contro molecole riconosciute come antigeni. Sono caratterizzati dalla presenza di un B-cell receptor in grado di riconoscere direttamente e legare molecole antigeniche, inoltre funzionano come APC. Nonostante nei cani sintomatici sia manifesta un'intensa attività dei linfociti B il loro frequenza risulta diminuita nel sangue periferico rispetto agli individui oligosintomatici e asintomatici (Reis et al., 2006). La riduzione della frequenza dei linfociti B è stata attribuita alla loro migrazione selettiva negli organi linfoidi (21).

La percentuale di linfociti T nel sangue periferico (periferal blood, PB) del cane rappresenta circa il 70% dei leucociti (Byrne et al., 2000; Faldyna et al., 2001). Nei cani sintomatici è stata riconosciuta una riduzione della frequenza dei linfociti T nel sangue periferico (Moreno et al., 1999; Hailu et al., 2005), questo fatto è una possibile conseguenza del reclutamento di queste cellule negli organi parassitati o del loro stato di anergia a livello sistemico (cita macro T cell interaction).

In particolare la diminuzione della sottopopolazione dei linfociti T CD4+ è stata messa in relazione allo stato di malattia; questa diminuzione diventa meno marcata fino a ritornare ai valori normali dopo il trattamento della malattia (Bourdoiseau et al., 1997a,b; Moreno et al., 1999; Guarga et al., 2000; Reis et al., 2006; Guerra et al., 2009). Inoltre è stato osservato un'espansione del numero dei linfociti T CD4+ nei cani sottoposti a immunoterapia e negli animali vaccinati (Guarga et al., 2000; Borja-Cabrera et al., 2004; Araújo et al., 2009) ed è stata associata ad un ridotto numero di parassiti nei tessuti. Al contrario, altri autori riportano che il numero dei linfociti T CD4+ nel sangue periferico dei cani malati è paragonabile a quello dei cani sani e sostengono che non ci sia correlazione tra lo stato clinico e il conteo dei linfociti T CD4+. Questi risultati contraddittori sottolineano la complessità della risposta immunitaria scatenata in risposta

all'infezione da *L. infantum* e suggeriscono che il conto dei linfociti T CD4+ preso da solo non costituisce un buon marker per la prognosi.

I linfociti T CD3+ CD4CD8 negativi (double negative CD4CD8; dnCD4CD8) sono presenti normalmente nel sangue periferico a bassa frequenza (intorno al 3%). Questa sottopopolazione cellulare include linfociti con TCR a catene $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ e possono essere attivati da antigeni estranei non presentati dal MHC (Lanier et al., 1986; Beetz et al., 2008). Queste cellule inoltre sono coinvolte nei meccanismi difensivi contro le infezioni epiteliali e mucosali (Antonelli et al., 2006). I livelli dei linfociti T CD3+dnCD4CD8 sono ridotti significativamente nel sangue periferico dei cani asintomatici rispetto ai cani sintomatici, in correlazione con bassi livelli di parassiti e una debole risposta umorale.

I linfociti T CD8+ sono stati implicati nel controllo delle specie visceralizzanti di *Leishmania* nell'uomo (Mary et al., 1999) e nel topo (Tsagozis et al., 2003; Gomes-Pereira et al., 2004a). Nella specie canina solo pochi studi hanno dimostrato il coinvolgimento dei linfociti T CD8+ nella CanL, e il primo di questi condotto da Pinelli et al., (1995) ha dimostrato che linee cellulari di linfociti T CD8+ derivanti da cani asintomatici sono

capaci di esercitare attività citolitica diretta su macrofagi infetti con *L. infantum*. I linfociti T CD8⁺ sono cellule del sistema immunitario adattativo che vengono attivate dalle APC tramite il legame con le molecole MHC I, che espongono antigeni di origine intracellulare. Una volta attivati sono in grado di secernere citochine e svolgere un'azione citotossica, supportando la funzione cellulo-mediata del sistema immunitario. Nei cani naturalmente infetti una è stata descritta una riduzione della popolazione dei linfociti T CD8⁺ nel sangue periferico che torna progressivamente a livelli normali dopo il trattamento farmacologico (Bourdoiseau et al., 1997). L'aumento della frequenza dei linfociti T CD8⁺ è considerata principale caratteristica fenotipica degli individui con forma asintomatica (Reis et al., 2009).

Strettamente legato alla funzionalità dei T CD8⁺ nel corso di malattie croniche è il fenomeno della “T cell exhaustion”. Recenti studi hanno dimostrato che questo paradigma inizialmente attribuito esclusivamente a modelli virali cronici può essere esteso, anche se con notevoli differenze, alle malattie protozoarie tra cui la leishmaniosi. Il fenomeno della CD8⁺ exhaustion, letteralmente “esaurimento CD8⁺”, rappresenta una situazione enigmatica dove le cellule T perdono la loro funzione. Infatti durante l'infezione acuta i linfociti T CD8⁺ sono in grado di eliminare il patogeno e

sviluppare una robusta memoria T antigene-indipendente che consiste nella capacità di sviluppare una rapida risposta funzionale dietro la riesposizione all'antigene (Wherry, 2011). Durante lo stadio cronico invece le cellule T antigene-specifiche diventano disfunzionali in diversi gradi e vengono eliminate (Blackburn et al., 2009). La perdita della funzione citotossica, la diminuzione o la perdita dell'espressione delle citochine (IL-2, TNF- α , IFN- γ) la mancata o diminuita risposta alla riattivazione e la riduzione della proliferazione antigene-indipendente, sono tutte condizioni da riferire al paradigma da "esaurimento" dei Linfociti T CD8+. Molteplici fattori quali il carico antigenico, la durata dell'infezione, l'intervento dei T helper CD4+ e i tipi di cellule presentanti l'antigene possono influenzare l'intensità dell'esaurimento T CD8+ (Angelosanto and Wherry, 2010). Direttamente coinvolti nella regolazione del fenomeno della T cell exhaustion sono alcuni recettori inibitori, specialmente i PD1-PDL1 (Programmed Death 1-Programmed Death Ligand 1) (Shin, H. et al. 2009). Infatti nel corso dell'infezione acuta le cellule T esprimono recettori inibitori solo transitoriamente subito dopo l'attivazione, mentre i linfociti T CD4+ e CD8+ in esaurimento esprimono queste molecole costantemente. Il blocco del segnale di questi recettori comporta un ripristino della funzionalità delle cellule T CD8+ e una ripresa nell'eliminazione del patogeno (Blackburn et

al., 2009). Oltre ai recettori inibitori anche alcune citochine quali l'IL-10 e il Transforming Growth Factor- β (Ejrnaes. et al., 2006; Tinoco et al., 2009) contribuiscono all'esacerbazione dell'esaurimento T CD8+, almeno nel modello virale. Similmente ai T CD8+ anche i linfociti TCD4+ possono diventare disfunzionali nel corso delle infezioni croniche (Wherry, 2011), anche se le informazioni su questo argomento sono limitate. In conformità a quanto è stato descritto sul modello virale, il blocco dell'interazione PD1-PDL1 in corso di leishmaniosi viscerale nel topo aumenta la sopravvivenza dei linfociti T CD8+ in fase di esaurimento (Karp et al., 1993; Hernandez-Ruiz et al., 2010). Altri studi recenti, che utilizzano parassiti transgenici di *Leishmania donovani* che esprimono Ovalbumina per indurre una forma di leishmaniosi viscerale nel topo, dimostrano come un aumento dell'espressione del recettore PD1 sui linfociti T CD8+ sia concomitante alla perdita della loro funzione effettrice, caratterizzata dalla compromissione dell'espressione dell'IL-2, del TNF- α e dell'IFN- γ , suggestivo del paradigma dell'esaurimento (Joshi et al. 2009). È interessante che le cellule col fenotipo da esaurimento si localizzino in maniera organo-specifica nella milza, dove persiste l'infezione cronica da *Leishmania*. Studi successivi rivelano che la molecola PDL-1 viene espressa al alti livelli dalle DC della milza contemporaneamente alla sviluppo del fenotipo da esaurimento nei

linfociti T (Joshi et al. 2009). Questi dati suggeriscono che la T cell exhaustion abbia luogo durante l'infezione da *Leishmania* e possa contribuire all'esacerbazione dell'infezione. Inoltre il blocco in vivo dell'interazione PD1-PDL1 o il trattamento ex-vivo di cellule T CD8+ con agonisti dei TLR2, è in grado di restaurare parzialmente la funzionalità di queste cellule (Hernandez-Ruiz et al., 2010) suggerendo una possibilità terapeutica nel trattamento delle forme croniche della malattia.

Citochine

L'espressione o la produzione dell'IFN- γ dalle cellule del sangue periferico non stimolate o stimolate con antigeni solubili di *Leishmania* (SLA) in animali infetti è stato correlato alla resistenza alla malattia o allo stato asintomatico, sia negli animali vaccinati che in quelli non vaccinati (Manna et al., 2006; Carrillo et al., 2007) e anche in animali sottoposti a challenge con promastigoti isolati da *Lutzomyia Longipalpis* (Collin et al., 2009). A sostegno di questi dati altri autori hanno messo in relazione la deplezione dell'IFN- γ prodotto dai linfociti del sangue periferico allo sviluppo della sintomatologia in studi fatti su cani sperimentalmente infetti (Carrillo e Moreno, 2009; Saridomichelakis, 2009; Carrillo et al., 2007). Travi et al.(2009) invece hanno osservato che i leucociti del sangue periferico prelevati da cani sintomatici e stimolati con SLA sono in grado di produrre

alti livelli di IFN- γ sin dagli stadi iniziali della malattia e con la progressione una proporzione sempre maggiore di individui esprime alti livelli di questa citochina infiammatoria.

2.4.2 L'immunità organo-specifica

Nonostante lo spettro delle citochine e l'immunofenotipo cellulare vengano presi come markers per predire l'evoluzione dell'infezione da *Leishmania* il sangue periferico non è tessuto di elezione per la replicazione e persistenza dei parassiti.

La determinazione del ruolo delle sottopopolazioni di linfociti T-helper1 (Th1) e T-helper2 (Th2) nei differenti organi e tessuti di cani infetti è cruciale per capire i meccanismi immuni indotti dall'infezione di *Leishmania*. Numerosi studi condotti sulle cellule del sangue periferico hanno descritto che la risposta cellulare immune nella CanL è associata con l'attivazione delle cellule Th1 produttrici di IFN- γ , IL-2 e TNF- α , mentre il pattern citochinico della malattia attiva è caratterizzato da una risposta mista Th1/Th2 (Carrillo e Moreno, 2009). In seguito è stato dimostrato che la risposta immunitaria contro i parassiti non è identica in tutto il sistema dell'ospite, ma piuttosto organo specifica (Reis et al., 2009). Infatti una

risposta Th1, Th2 o mista Th1/Th2 è stata osservata nei diversi organi di cani infetti con *L. infantum* e correlata con la presenza o l'assenza di sintomi clinici e carica parassitaria locale (Boggiatto et al., 2010; Branchelente et al., 2005; Menezes-Souza et al., 2011)

Cute

La cute è l'organo coinvolto in primis nella trasmissione di *Leishmania*. Infatti è nei tessuti cutanei che gli artropodi acquisiscono l'infezione e dove a loro volta inoculano i parassiti nell'ospite vertebrato, rappresenta anche la prima barriera della risposta immune.

Varie cellule presenti nella cute quali i linfociti T intraepiteliali e le cellule di Langerhans sono capaci di generare una reazione immunitaria locale. Branchelente et al. (2005) hanno dimostrato che la risposta immune locale nel contesto della cute lesionata dei cani naturalmente infetti è caratterizzata dall'espressione di IFN- γ , e TNF- α e IL-4. L'aumento dell'espressione dell'interleuchina-4 è stata associata alle manifestazioni cliniche più severe e ad un aumento della carica parassitaria nelle biopsie cutanee. In particolare le lesioni con alopecia e adenite sebacea sono state associate ad una immunità effettrice caratterizzata dall'attivazione delle cellule di Langerhans, la sovra-espressione delle molecole MHC II sui cheratinociti, l'infiltrazione

nel derma da parte dei linfociti T CD8+ ed un basso numero dei linfociti T CD8+, presenza di linfociti B CD21+ e una presenza di parassiti relativamente bassa. D'altra parte, i cani con forme nodulari generalizzate manifestano una risposta immunitaria inadeguata con bassa espressione di MHC II a livello epidermico, basso numero di linfociti T nell'infiltrato dermico e un'alta carica parassitaria (Fondevila et al., 1997). Nei cani asintomatici un profilo citochinico misto Th1/Th2 (12), indicando che un bilanciamento tra il profilo immunitario infiammatorio e regolatore della risposta immunitaria a livello locale è importante per il mantenimento di bassi livelli di replicazione parassitaria dello stato clinico.

Linfonodo

I linfonodi (LN) sono largamente accettati come primo rilevante tessuto linfoide colpito dopo la disseminazione dei parassiti dai macrofagi in sede cutanea. Nei LN dei cani naturalmente infetti con *L. infantum* è stato descritto un aumento della popolazione linfocitaria T, in particolare dei T CD8+, abbinati ad una diminuzione dei linfociti B CD21+ e una sovra-regolazione delle molecole MHC II. Curiosamente il maggior numero di cellule T CD8+ è stato incontrato negli individui caratterizzati dai più alti livelli di parassitismo cutaneo (Giunchetti et al.,2008). Secondo gli autori i

linfociti T CD8+ nei linfonodi potrebbero presentare un diverso stato di attivazione durante la CanL, probabilmente con funzione immunomodulatoria o cellulo-soppressiva. In effetti l'effetto immunomodulatorio di queste cellule è stato recentemente osservato da altri autori, che hanno riscontrato questa sottopopolazione di CD8+ nei linfonodi dei cani trattati significativamente ridotta rispetto quella dei cani asintomatici (Alexandre-Pires et al., 2010).

La popolazione linfociti T CD4+ sia nei linfonodi dei cani asintomatici che trattati è significativamente più alta rispetto a quella degli individui non infetti (Reis et al., 2009).

Tutte queste osservazioni, messe assieme, fanno concludere che l'attivazione dei linfociti nei LN con l'espansione della sottopopolazione CD4+ probabilmente favorisce il controllo di dell'infezione di *Leishmania* attraverso la riduzione locale della replicazione parassitaria e l'eliminazione dei parassiti, mentre un innalzamento del numero di CD8+ sembra correlato alla persistenza dei parassiti e all'attività immunomodulatoria cellulare. Anche la diminuzione dei linfociti CD3+ dnCD8CD4 si pensa possa contribuire alla persistenza dei parassiti (Alexandre-Pires et al., 2010)

Riguardo il profilo citochinico è stato documentato che i linfonodi poplitei e prescapolari dei cani asintomatici hanno un incremento nell'espressione di

citochine pro-infiammatorie e un basso livello di parassiti indicando che l'IFN- γ e il TNF- α sono coinvolti nella protezione contro la malattia. I linfonodi di animali sintomatici esprimono livelli più alti di citochine antiinfiammatorie, suggerendo una responsabilità per l'IL-10 e TGF- β nella progressione della malattia (Alves et al., 2009). Inoltre Maia e Campino (2011) suggeriscono che il bilanciamento tra l'espressione dell' IL-10 e TNF- α sia responsabile non solo dalla carica parassitaria in questi tessuti ma anche nelle cute, nel fegato e nella milza e anche dell'assenza della linfadenomegalia.

Fegato

Il fegato è uno degli organi più importanti coinvolti nell'interfaccia ospite-parassita nel corso dell'infezione da *Leishmania*, e nonostante questo pochissimi studi si sono dedicati alla quantificazione delle citochine prodotte nel fegato di cani infetti. La letteratura attuale riporta una produzione di IFN- γ , IL-10 e TGF- β 1 e iNOS più elevata nel fegato di cani infetti in assenza di sintomatologia clinica (Corrêa et al., 2007), Maia e Campino, 2011). La presenza di *Leishmania* nel fegato comporta la formazione di granulomi di diversa entità che sono considerati un tentativo dell'organismo di controllare la replicazione dei parassiti. Il TNF- α è coinvolto nella

formazione del granuloma epatico e contribuisce alla risoluzione dell'infezione locale nel modello murino. In relazione a questo fatto a mancata espressione di TNF- α negli epatociti di cani sperimentalmente infetti può essere associata all'alto livello di parassitismo riscontrato nell'organo (Maia et al., 2010, Maia e Campino, 2011).

Milza

La milza è l'organo principale responsabile della risposta immunitaria contro *Leishmania*. La CanL è associata con la distruzione dell'architettura splenica, che è caratterizzata dalla disorganizzazione del normale tessuto linfoide, perdita della normale diversità leucocitaria attraverso la sostituzione dei leucociti con plasmacellule ed eventuale atrofia del tessuto linfoide (Sanchez, 2004). Nei cani infetti è stata documentata una correlazione positiva tra la produzione di IL-10 da parte degli splenociti e l'incremento della carica parassitaria con progressione della malattia (Lage et al.,2007;Santana et al.,2008), suggerendo che l'IL-10 nel contesto del granuloma splenico stabilisca le condizioni immunologiche per la sopravvivenza del parassita. Al contrario Strauss-Ayali et al. (2010) non hanno trovato alcuna variazione nell'espressione dell'IL-10 e suggerisce che un precoce aumento dell'IL-4 possa avere un ruolo nella persistenza del parassita in presenza di alti livelli

di IFN- γ . A sostegno di quest'ipotesi ci sono studi condotti su cani infettati sperimentalmente che riportano l'espressione dell' IFN- γ solo nei tessuti epatico, splenico e midollare con alta carica parassitaria (Maia e Campino, 2011), ipotizzando che la presenza di questa citochina non sia sempre sinonimo di eliminazione del parassita. È ipotizzabile che la generazione di nuovi parassiti disseminati in altri tessuti infetti stimolino l'espressione dell' IFN- γ (Strauss-Ayali et al., 2007). Dopo il trattamento i livelli dell' IFN- γ e delle chemochine diminuiscono significativamente e si riflettono in un ridotto reclutamento delle cellule immunitarie nella milza dovuto ad una minima presenza dei parassiti nella milza. La fonte cellulare di questo IFN- γ non è conosciuta e probabilmente non deriva dalle cellule T dal momento che i cani sintomatici manifestano una deplezione di queste cellule nella milza e uno stato specifico di immunosoppressione contro il parassita. Per quanto concerne i T CD8+, è stato riscontrato un loro aumento nell'organo in reazione a bassa carica di parassiti (Guerra et al. 2009).

Midollo Osseo

La progressione dell'infezione da *Leishmania* è stata relazionata con una infiammazione granulomatosa del midollo osseo accompagnata da un incremento percentuale dei linfociti e delle plasma cellule, ipoplasia e/o displasia eritroide e megacariocitaria ed eritrofagocitosi (Maia e Campino,2008). La displasia megacariocitica ed eritrocitaria sono state relazionate ad un incremento del numero di macrofagi attivati che producono alti livelli di IFN- γ e TNF- α (Manzillo et al.,2006). L'accumulo di queste citochine nel midollo osseo è stata osservata sia in cani sintomatici che in assenza di sintomatologia clinica, mentre l'aumento dell' IL-4 è stata correlata con la severità della malattia(Quinnell et al., 2001). Questa citochina non è espressa dalle cellule del midollo osseo, che esprimono invece iNOS e un profilo citochinico misto pro-infiammatorio (TNF- α) e regolatorio (TGF- β and IL-10) nei cani asintomatici (Maia e Campino 2011). In relazione a ciò è stato ipotizzato che la risoluzione asintomatica della malattia nel cane nonostante l'alta carica parassitaria nella milza, nel fegato e nel midollo osseo sia da relazionare alla mancata di espressione della IL-4 in questi organi (Alexandre-Pires, 2010). L'aumento dell'espressione delle molecole MHCII nei linfociti del midollo sia dei cani sintomatici che sintomatici e trattati riflette la presentazione degli antigeni di *Leishmania*.

Non sono state riportate differenze tra le popolazioni di linfociti T CD4+ e CD8+ tra cani sintomatici, asintomatici e trattati suggerendo che il controllo dell'infezione nel midollo osseo non sia da mettere in relazione con l'espansione di queste cellule (Maia e Campino, 2011). Alexandre-Pires et al. (2010) ha descritto una significativa riduzione dei linfociti T CD3+ CD4CD8 positivi (dpCD4CD8) e dnCD8CD4 nel midollo osseo dei cani trattati in confronto a cani sintomatici per la CanL e facendo ipotizza il loro sequestro in altri compartimenti come il fegato e la cute, impegnati a contrastare la replicazione dei protozoi. I linfociti T CD3+ dpCD4CD8 sono considerate cellule di origine extra-timica (Zuckermann, 1999) e sono state osservate nell'uomo e in diverse specie animali (Zuckerman and Husmann,1996; Akari et al., 1997; Kenny et al., 2000). Anche se l'attività funzionale dei linfociti T dpCD4CD8 no è ancora stata chiarita, questa sottopopolazione sembra avere funzioni citotossiche e helper (Zuckermann, 1999; Nam et al., 2000). L'espansione di questa sottopopolazione è stata descritta in associazione con tumori (Desfranc, ois et al., 2009), malattie autoimmunitarie (Matsui et al., 1989) e infezioni virali (Weiss et al., 1998; Suni et al., 2001).

2.5 L'immunità umorale

La leishmaniosi canina è associata ad una marcata risposta umorale, che non è protettiva e porta al fallimento nel controllo dell'infezione. I livelli delle immunoglobuline nel sangue sono considerati marcatori della risposta umorale: negli animali sintomatici sono considerevolmente più elevati di quelli nel sangue di cani asintomatici ed è stata riconosciuta una marcata associazione fra i livelli ematici delle immunoglobuline, lo stato clinico e la densità parassitaria nei tessuti (Reis et al., 2006). La CanL presenta caratteristiche simili alla forma viscerale umana (Kaye and Aebischer, 2011). Le classi di IgA, IgE e IgM sono dimostrate essere marker della malattia (Almeida et al., 2005; Rodríguez- Cortéz et al., 2007b). Anche l'aumento delle IgG è stato documentato e (Nogueira et al., 2005) in particolare con la sottoclasse IgG1 è stata associata alla correlato allo sviluppo della sintomatologia, mentre la sottoclasse IgG2 aumenta nel sangue degli individui naturalmente resistenti e negli individui vaccinati (Deplazes et al.,1995; Bourdoiseau et al.,1997; Nieto et al.,1999; Solano-Gallego et al., 2001; Santana et al.,2002; Mendes et al.,2003; Quinnell et al., 2003; Ramiro et al.,2003; Borja-Cabrera et al.,2004; Fujiwara et al.,2005; Rafati et al.,2005; Santos et al.,2007). Risultati discordanti sono stati

riportati per quanto riguarda il le IgG2 che associano un aumento del loro livello nel sangue dei cani sintomatici (Vercammen et al., 2002; Fernandez-Perez et al., 2003; Iniesta et al., 2005; Reis et al., 2006; Day, 2007). La discrepanza di questi risultati può essere dovuta sia ad una differenza nella titolazione del coniugato anti-dog (Mendez et al., 2003) , sia alla differenza di affinità dell'antigene utilizzato. I lavori che difendono l'associazione tra le IgG2 e sintomatologia utilizzano antigene di promastigoti crudi (Vercammen et al., 2002; Fernandez-Perez et al., 2003; Rafati et al., 2005; Reis et al., 2006), mentre gli autori che difendono il predominio delle IgG2 nei cani vaccinati utilizzano antigeni purificati o ricombinanti (Nieto et al., 1999; Santana et al., 2002; Ramiro et al., 2003; Fujiwara et al., 2005; Rafati et al., 2005). È stato dimostrato infatti che gli antigeni ricombinanti interagiscono solo con una frazione degli anticorpi del siero, mentre il lisato totale interagisce con tutto lo spettro di anticorpi diretti contro il parassita (Rafati et al., 2005; Palatnik- de-Sousa, 2008).

Capitolo 3

La leishmaniosi canina

3.1 Patogenesi

Le diverse razze canine mostrano distinta suscettibilità alla leishmaniosi. Alcune razze come il Pastore Tedesco e il Boxer sembrano essere tra le più suscettibili (Abranches et al., 1991, Sanchez-Robert et al., 2005), mentre altre quali il Podenco Ibicenco sono considerate resistenti (Solano-Gallego, 2000). Inoltre i maschi sembrano essere più colpiti rispetto alle femmine dalla leishmaniosi (Brandonisio et al., 1992; Fisa et al., 1999), come è stato riportato nell'uomo (Shiddo et al., 1995) e nella cavia (Travi et al., 2002). I cani si possono infettare a qualsiasi età, ma la prevalenza dell'infezione è maggiore nei cani sotto i tre anni e nei cani tra gli otto e i dieci anni di età (Alvar et al., 2004).

Le manifestazioni cliniche e l'evoluzione della leishmaniosi sono una conseguenza delle complesse interazioni tra il parassita e il sostrato genetico e immunologico dell'ospite. Nelle patogenesi di *Leishmania* spp si distinguono tre momenti: il primo è l'ingresso del parassita nel macrofago

che diviene nicchia di replicazione in conseguenza dell'inibizione dei propri meccanismi antimicrobici; il secondo è lo stabilimento dell'infezione dovuto alla moltiplicazione della popolazione parassitaria e l'eventuale evoluzione della malattia che dipendono entrambe dal tipo di immunità sviluppata dall'ospite; il terzo è determinato dalla diffusione e persistenza dell'infezione nei tessuti nella fase cronica della malattia. *Leishmania* tende a localizzarsi nei tessuti dove si le cellule della linea monocito-macrofagica sono presenti in grande numero. Nei mammiferi suscettibili all'infezione *L. infantum* causa infezioni solitamente di tipo cronico, che in alcuni casi possono evolvere in forme subcliniche piuttosto che in chiare forme sintomatiche. La risposta immunitaria rappresenta il vero determinante che può spostare l'ago della bilancia dall'infezione alla malattia.

I linfociti Th CD4+ infatti possono modulare il sistema immunitario verso una risposta prevalentemente umorale (Th2) o cellulo-mediata (Th1). Gli animali resistenti non presentano sintomatologia e hanno bassi livelli di anticorpi anti-*Leishmania* e carica parassitaria nei tessuti, sviluppano una forte risposta linfoproliferativa in vitro e una risposta positiva di ipersensibilità ritardata nei confronti degli antigeni di *Leishmania* nella cute. Negli animali suscettibili, invece, la progressione dell'infezione in forma di malattia attiva è caratterizzata da una marcata risposta umorale, una

inadeguata risposta cellulare nei confronti del parassita e la manifestazione di una gamma di sintomi clinici. In questi casi la continua stimolazione antigenica è l'eccessiva produzione di anticorpi provoca un ipergammaglobulinemia cronica e il deposito di immunocomplessi che possono provocare glomerulonefrite, uveite e meningite assieme alla produzione di autoanticorpi contro piastrine, eritrociti e anticorpi anti-nucleo. Inoltre i cani malati o con malattia subclinica in associazione ad una importante risposta umorale sono caratterizzati da una disseminazione dei parassiti in diversi tessuti, e uno stato di immunosoppressione.

3.2 Sintomi

Le manifestazioni cliniche più comuni sono febbre, anoressia, la perdita di peso, lesioni cutanee, linfoadenopatia periferica, nefropatia ed epatopatia cronica, poliartrite, anemia, leucocitosi neutrofilia, ipoalbuminemia e iperglobulinemia (Ferrer, 1992; Kontos, 1993; Koutinas et al., 1993; Slappendel, 1988). Poiché la situazione clinica solitamente riflette una disfunzione multioraganica, è possibile riscontrare qualsiasi combinazione di sintomatologia (Kontos, 1993).

Le lesioni cutanee sono fra i sintomi più comuni di CanL e possono presentarsi da sole o in associazione ad altri sintomi (Slappendel, 1988, Koutinas et al., 1993). La dermatite esfoliativa e la seborrea secca iniziano usualmente dalla testa e dai padiglioni auricolari, si estendono in seguito al resto del corpo (Koutinas et al., 1993). Le ulcerazioni cutanee indolenti e non pruriginose si presentano generalmente nei punti del corpo sottoposti a pressione (ad es. gomiti), ai margini dei padiglioni auricolari e a livello delle giunzioni mucocutanee. Si pensa che siano dovute ad una vasculite necrotizzante da immunocomplesso più che all'azione diretta del parassita (Slappendel, 1988, Pumarola et al., 1991) , in quanto raramente gli amastigoti sono presenti nella citologia di queste lesioni. Le lesioni di tipo nodulare che si riscontrano raramente e soprattutto nel boxer dimostrano sempre la presenza di un gran numero di parassiti all'esame citologico (Ferrer et al., 1988; Ciaramella et al., 1997).

L'ipercheratosi nasale e digitale rappresenta un'altra lesione molto frequente, come l'onicogrifosi e la paronchia che si ipotizza siano una conseguenza della moltiplicazione dei parassiti a livello del letto ungueale (Catarssini, 1981).

All'immunosoppressione indotta dalla leishmaniosi, inoltre è attribuita l'aumentata frequenza delle piodermiti batteriche superficiali e profonde che spesso accompagnano le altre lesioni cutanee (Carlotti, 1990).

La stomatite ulcerativa in casi di CanL può essere ascritta all'uremia causata dall'insufficienza renale cronica ed è da contestualizzare nella fotografia clinica di questa sindrome; oppure si manifesta in forme e localizzazione tipiche di alcune malattie autoimmuni della pelle del cane quali il pemphigus vulgaris, e il lupus erythematosus sistemico.

In corso di leishmaniosi canina una percentuale di cani compresa fra l' 80% e il 100% riporta un a linfadenopatia iperplastica e/o epatosplenomegalia (Slappendel, 1990, Keenan et al., 1984; Nelson and Couto, 1992). La linfadenopatia è generalizzata nella stragrande maggioranza dei casi ed è identificata prevalentemente nel linfonodo prescapolare o popliteo. Anche l'ipoplasia linfonodale può essere riscontrata in corso di CanL, ed è caratteristico delle forme oramai protratte e associate ad insufficienza renale avanzata (Kontos, 1993).

La splenomegalia, sintomo tipico della CanL, solitamente è subclinica e rilevabile attraverso l'ultrasonografia; solo una percentuale di cani piuttosto bassa presenta splenomegalia rilevabile alla palpazione.

L'insufficienza epatica cronica, conseguenza di epatite cronica e' un evento che occorre solo in una piccola percentuale dei casi di CanL.

Il coinvolgimento renale, evenienza comune in corso di CanL, e' conseguenza di una glomerulonefrite da immunocomplesso, nefrite interstiziale raramente con amiliodosi (Slappendel, 1988, Koutinas et al., 1995; Poli et al., 1991). Le lesioni renali possono portare ad uno stato di insufficienza renale cronica, sindrome nefrotica, quest'ultima molto meno comune, o entrambe. Le lesioni renali associate a CanL sono irreversibili e sono responsabili dello stato cachettico caratteristico degli animali in fase cronica della malattia.

L'atrofia dei muscoli masticatori, in particolare e' un sintomo attribuibile alla natura catabolica della malattia (Dedet, 1985; Kontos, 1993), anche se alcuni autori hanno dimostrato come una polimiosite immunomedita e progressiva, che coinvolge la muscolatura di tutto il corpo, sia la base patologica dell'atrofia muscolare (Vamvakidis et al., 1999). Questa polimiosite non sembra causare ne' disfagia ne' problemi locomotori che in corso di CanL sono associati a forme erosive o non erosive di poliartrite (Wolschrijn et al., 1996; Spreng, 1993.). Altre cause di zoppia connesse alla condizione di leishmaniosi nel cane sono l'onicogrifosi in forma grave,

l'ipercheratosi dei polpastrelli, la dermatite interdigitale e lesioni ossee (Turrel et al., 1982).

L'epistassi nel quadro della CanL solitamente è monolaterale ed intermittente e in rari casi si presenta come un'emergenza a causa dell'importante perdita di sangue. La sua patogenesi si crede che sia dovuta alla combinazione di lesioni infiammatorie e ulcerative a livello della mucosa nasale spesso accompagnate ad una diatesi nell'emostasi (Slappendel, 1990; Ferrer, 1992).

La colite cronica e l'enterite cronica (Ferrer et al., 1991) sono manifestazioni poco comuni e generalmente legate ad una sindrome uremica cronica. La perdita di sangue da ulcerazioni del tratto digerente che si manifestano nell'ematochezia, è uno dei sintomi più comuni.

Una grande varietà di lesioni oculari sono state associate alla CanL, e tra queste sono incluse blefariti, congiuntiviti, cheratiti, uveiti e infiammazioni della sclera (Ferrer, 1992; Slatter and Chambers, 1990). Le lesioni sono un conseguenza non solo del parassitismo oculare da parte di *Leishmania*, ma soprattutto del meccanismo immuno-mediato (Slappendel, 1988). L'uveite, causata dal deposito di immunocomplessi, può causare se non trattata

glaucoma o panoftalmite con conseguente perdita della visione. La cheraticongiuntivite secca invece, spesso associata alla congiuntivite sembra sia il risultato della distruzione dell'apparato lacrimale da parte del parassita (Roze, 1996).

3.3 Rilievi ematologici e biochimici

I rilievi ematologici in corso di CanL includono anemia, di entità variabile, da leggera a molto grave. L'anemia è generalmente di tipo non rigenerativo, normocitica e normocromica (Ferrer, 1992; Ciaramella 1997). La patofisiologia del fenomeno anemico sembra essere legata principalmente allo stato di infiammazione cronica caratteristico della malattia, anche se l'insufficienza renale cronica e la perdita di sangue tramite epistassi e il tratto gastrointestinale possono contribuire assieme ad alcuni disordini del midollo osseo (Ferrer, 1992; Kontos, 1993). La produzione di anticorpi anti-piastrine, e anti-eritrociti e anti-nucleo suggeriscono un probabile contributo autoimmune o immuno-mediato all'insorgere dell'anemia (Cabral et al., 1992; Ferrer, 1992, Koutinas et al., 1993). Comune riscontro ematologico è una leucocitosi neutrofila, spia dello stato d'infiammazione cronica (Sellon, 1992). Nelle forme protrate e severe di CanL il quadro ematologico che si

affianca alla marcata anemia è invece di leucopenia in concomitanza con linfopenia, eosinopenia e monocitopenia. (Reis et al., 2006a,c).

L'incremento dei livelli delle proteine totali del siero è attribuito alla risposta umorale policlonale ed è associata ad una concomitante ipoalbuminemia con diminuzione del rapporto albumine/globuline. (Marzochi et al., 1985; Reis et al., 2006a). L' ipoalbuminemia è esacerbata alla nefropatia proteinurica, al coinvolgimento epatico, alla malnutrizione che accompagna l'anoressia, o alla combinazione di tutti questi fattori.

L'azotemia renale (BUN> 30 mg/dl; creatinina> 1.5 mg/dl; fosfato> 5 mg/dl) risulta incrementata negli animali con insufficienza renale in corso.

L'incremento degli enzimi epatici (ALT> 34 U/dl; ALP> 120 U/dl) è indice di epatopatia in corso. I casi di insufficienza epatica, che comunque non è un reperto comune in caso di CanL, spesso si accompagnano ad ascite.

3.4 La diagnosi

3.4.1 Esame fisico e diagnostica per immagini

I segni clinici più comuni di leishmaniosi nel cane sono l'aumento di dimensione dei linfonodi e le lesioni cutanee. Comunque, una vasta ed eterogenea gamma di sintomi e lesioni possono essere riscontrate nel corso del corso dell'esame clinico (Slappendel et al.,1988; Ciaramella et al., 1997). Alcuni di questi sintomi, quali l'epatosplenomegalia, possono essere identificati con maggiore efficienza attraverso la diagnostica per immagini. Attraversi le informazioni ottenute dal segnalamento il clinico decide se includere la leishmaniosi tra le diagnosi differenziali e procedere con gli esami di laboratorio più appropriati.

3.4.2 Analisi di laboratorio

Le indagini di laboratorio di base includono Cell Blood Counting (CBC), le analisi biochimiche del siero, l'elettroforesi delle proteine del sangue e l'urianalisi. In corso di CanL questi test permettono di identificare una o più alterazioni associate alla malattia (Slappendel et al.,1988; Ciaramella et al., 1997).

3.4.3 Diagnosi etiologica

Per identificare i parassiti o la risposta immunitaria del paziente contro di loro, esistono vari metodi integrati disponibili (Maia and Campino, 2008).

Le metodiche diagnostiche sono suddivise in due categorie : dirette ed indirette

Diagnosi diretta

I metodi di diagnosi etiologica diretta si basano sull'identificazione del patogeno negli organi e tessuti del paziente. L'identificazione di Leishmanie in organi bersaglio quali linfonodo e midollo osseo non sono sempre indicativi di infezione in corso e di conseguenza non permette di concludere che la sintomatologia osservata sia da ricondurre alla presenza dei parassiti. Invece l'identificazione dei parassiti nel contesto di tessuti che portano delle lesioni consistenti con leishmaniosi, è un buon indizio che *Leishmania* sia causa di queste lesioni.

Citologia -L'esame citologico permette l'identificazione microscopica degli amastigoti nei macrofagi a livello dei tessuti lesi. Negli strisci cellulari è possibile identificare gli amastigoti anche a livello extracellulare, nel caso di cellule altamente infettate che si rompono liberando i parassiti

all'esterno. Negli stessi preparati è possibile identificare i cambiamenti citologici consistenti con leishmaniosi, quali infiammazione linfoplasmocitaria o di tipo granulomatoso-piogranulomatoso, iperplasia reattiva dei linfonodi, iperplasia mieloide o ipoplasia eritroide. L'esame citologico riguarda biopsie effettuate con ago sottile a livello delle lesioni papulari, nodulari e ulcerative della cute. Le lesioni ulcerative possono essere valutate anche per impressione su vetrino. Il midollo osseo e i linfonodi dovrebbero essere sottoposti a prelievo quando la sintomatologia suggerisce un loro coinvolgimento come nel caso, di anemia e linfadenomegalia. Anche fluidi prelevati da articolazioni colpite da artrite dovrebbero essere sottoposti a esame citologico. Gli organi in cui è più probabile riscontrare i parassiti in caso di mancanza di indicazione sintomatica specifica sono il midollo osseo, il linfonodo, la milza e il buffy coat isolato dal sangue periferico, in ordine decrescente di sensibilità diagnostica.

Istologia -I parassiti di *Leishmania* possono essere identificati in anche in sezioni di tessuto colorate con Ematossilina-Eosina, anche se l'identificazione morfologica degli amastigoti è più difficile rispetto ai preparati citologici.

Isolamento –L’isolamento in coltura dei parassiti di *Leishmania* è la metodica più specifica perché comprende lo sviluppo di promastigoti vivi ascrivibili alle specie di *Leishmania*. Il medium di isolamento è il blood agar base, non disponibile commercialmente, ma solo a livello dei laboratori specializzati. Il più grave difetto di questa tecnica sono i tempi lunghi richiesti dalla crescita dei promastigoti, che è di oltre 30 giorni (Gradoni et al., 2000).

PCR assay- Le tecniche di polymerase chain reaction (PCR) permettono di amplificare in modo specifico sequenze del DNA del genoma di *Leishmania*. Il metodo è al contempo molto sensibile, soprattutto quando vengono utilizzate sequenze di DNA multicopia come i geni per rRNA small subunit o i minicircoli del DNA kinetoplastidico come target per l’amplificazione (Muller et al., 2003). Per la diagnosi di *Leishmania* vengono utilizzate tecniche di PCR convenzionale, nested PCR e quantitative PCR (q-PCR).

La metodica q-PCR utilizza sonde fluorescenti per quantificare il numero di copie di DNA presenti in un campione biologico, a partire da una quantità predefinita di DNA preso come standard. La PCR quantitativa è considerata non solo il migliore approccio diagnostico, ma anche il golden standard per

monitorare l'efficacia del trattamento della malattia (Francino et al., 2006). Le tecniche molecolari si possono applicare facilmente a vari tipi di campioni biologici. Oltre ai tessuti con lesioni specifiche, i campioni con più possibilità di riscontrare il DNA dei parassiti sono il midollo osseo o i linfonodi, cute, congiuntiva, buffy coat e sangue periferico intero, in ordine di sensibilità decrescente (Maia and Campino, 2008). Per quanto riguarda il monitoraggio della terapia i tessuti di elezione sono considerati il midollo osseo ed il linfonodo. Come per le altre metodiche dirette, il rilievo di DNA di *Leishmania* nella cute e nel midollo di cani che vivono in regioni endemiche non è necessariamente indicativo di infezione in corso o sviluppo della malattia. Gli individui immunocompetenti infatti riescono a controllare la diffusione del parassita (Gradoni, 2002), e dagli stessi prelievi di questi soggetti effettuati nel breve periodo si ottiene spesso un risultato negativo (Oliva et al., 2006). Per l'analisi con PCR il materiale indicato sono campioni freschi o congelati o fissati in etanolo al 95%. I campioni fissati in formalina o inclusi in paraffina sono di qualità inferiore.

Analisi sierologica

Quando dei tessuti lesionati, inclusi il midollo osseo in corso di anemia, contengono evidenza citologica o molecolare della presenza di *Leishmania*, i

cani dovrebbero essere considerati affetti da leishmaniosi, senza considerare i risultati sierologici. Occorre sottolineare che questi cani solitamente hanno alti titoli di anticorpi specifici, con l'eccezione di rari casi in cui le lesioni altamente localizzate o situazioni di infezione molto precoce in cui la sintomatologia precede lo sviluppo di una risposta immunitaria specifica.

Quando nei tessuti non è riscontrabile la presenza dei parassiti, l'analisi sierologica diventa cruciale nello stabilire la diagnosi. Un alto titolo di anticorpi specifici conferma una diagnosi di CanL, mentre un basso titolo suggerisce che la condizione del paziente è attribuibile ad un disordine diverso dalla leishmaniosi.

La sieroconversione in corso di CanL può avvenire mesi dopo l'infezione, in un range che va da 1 a 22 mesi nei casi di infezione naturale, e da 1 a 6 mesi nel caso di infezione sperimentale (Moreno, 2002). Solo nei cani in cui il parassita ha disseminato nell'organismo gli anticorpi specifici raggiungono alti titoli o aumentano col passare del tempo. Le tecniche sierologiche utilizzate per il rilievo degli anticorpi anti-*Leishmania* sono il Western Blot, l'immunofluorescenza indiretta (IFAT), ELISA e i test immunocromatografici rapidi.

Tra questi il Western Blot offre una grande accuratezza diagnostica, ma è costoso e poco standardizzabile e viene utilizzato solo a scopo di ricerca

IFAT-Il test sierologico più comunemente utilizzato è l'IFAT, che è anche quello indicato da World Organization for Animal Health (OIE) come metodica sierologica di riferimento (Gradoni et al., 2000). L'IFAT viene allestito mettendo a contatto diverse diluizioni di siero su vetrini adsorbiti con promastigoti di *Leishmania*, il legame antigene anticorpo e la relativa concentrazione sono evidenziati dall'aggiunta di anticorpi secondari fluorescenti. La valutazione dell'intensità della fluorescenza al microscopio è lasciata all'interpretazione soggettiva dell'operatore, limite principale di questa tecnica che rimane comunque molto sensibile e specifica. Nonostante i titoli anticorpali non siano sempre associati alla severità della malattia, sono utili per identificare i cani con infezione subclinica che hanno bassi titoli rispetto a quelli con malattia conclamata, disseminazione dei parassiti e alti titoli di immunoglobuline. I termini basso e alto titolo vanno considerati con cautela e dovrebbero essere comparati con il valore soglia positivo dei laboratori di riferimento. Inoltre tra i laboratori non esiste accordo riguardo al valore soglia che può variare da 1:40 a 1:320

Il canine Leishmaniasis workig group (CLWG) descrive come alti i titoli di anticorpi che sono da 2 a 4 volte superiori alla soglia positiva e bassi, quelli compresi tra 1 e 2 volte i valori di riferimento del laboratorio di riferimento.

La specificità del test può essere compromessa dalla cross-reattività con *Trypanosoma cruzi*, specie endemica assieme a *Leishmania* nel centro e sud America

ELISA- Alcuni kit ELISA sono già disponibili commercialmente anche se la maggior parte dei dati disponibili sulle potenzialità diagnostiche del kit sono state raccolte da assay di manifattura. Il test ELISA è allestito disponendo diverse diluizioni di sieri su piastre ricoperte di antigeni di *Leishmania*. La positività è individuata e quantificata tramite reazione colorimetrica allo spettrofotometro. La metodica ELISA elimina il problema della soggettività d'interpretazione del risultato, è specifica e ha una sensibilità medio-alta in relazione agli antigeni scelti per l'allestimento. La sensibilità può essere aumentata molto con l'uso di antigeni multipli (Gradoni, 2002; Reithinger et al., 2002; Mettler et al., 2005) e porta a suo favore l'indiscusso vantaggio della quantificazione.

Oltre i kit ELISA sono disponibili commercialmente una serie dei kit immunocromatografici rapidi che differiscono per l'antigene o i reagenti utilizzati. Questi kit sono facili e veloci da usare per l'uso ambulatoriale ma hanno una sensibilità più bassa delle metodiche ELISA o IFAT. Quindi,

nonostante abbiano una specificità medio-alta, la sensibilità può arrivare sotto al 30% e non supera mai il 70%(Gradoni, 2002; , Reithinger et al., 2002; Mettler et al., 2005), rendendosi proni a dare risultati falsi negativi. Il vantaggio dei test immunocromatografici è che utilizzano antigeni in grado di eliminare la cross reattività con sieri anticorpi anti-Tripanosoma (da Costa et al., 2003).

Valutazione della risposta cellulare- Poichè la resistenza all'infezione da *Leishmania* è mediata dalla risposta cellulare, la sua valutazione è usata nella ricerca scientifica riguardo l'immunologia a e l'immunopatologia della CanL. Gli strumenti per queste indagini comprendono il test di linfoproliferazione in vitro, la citofluorimetria che identifica le sottopopolazione di linfociti T CD4+ e CD8+ e l'intradermoreazione ottenuta con la somministrazione di antigeni di *Leishmania*. Nessuna di queste metodiche è disponibile per la diagnostica in campo clinico.

3.5 La terapia

Tutti i farmaci anti-*Leishmania* conosciuti e usati nel cane sono stati scoperti e sviluppati per trattare la leishmaniosi nell'uomo. Nel cane questi farmaci

portano ad uno stato ad uno stato di remissione dei sintomi temporaneo o permanente, ma nessuno finora si è dimostrato in grado di eliminare l'infezione (Amusategui et al. 1998). Anche la maggior parte dei protocolli terapeutici sono stati sviluppati in studi clinici sull'uomo e quindi adattati al modello canino, spesso senza le necessarie informazioni sulla farmacocinetica specifica del cane. Gli obiettivi del trattamento anti-*Leishmania* nel cane sono solitamente rivolti ad una riduzione generalizzata del carico dei parassiti, trattare il danno tissutale causato dal parassita nei diversi organi, ristabilire una risposta immunitarie efficiente, mantenere un miglioramento della condizione clinica e trattare la ricaduta clinica. I farmaci più comunemente studiati per il trattamento della CanL sono i composti dell'antimonio (Amusategui et al. 1998; Solano-Gallego et al. 2001), l'allopurinolo (Cortese et al., 2008; Vercammen et al., 2002), le aminosidine (Belloli et al., 1995; Oliva et al., 1998; Poli et al., 1997, Vexenat et al., 1998), l'amfotericina B, il miltefosine (Manna et al., 2009; Mateo et al., 2009), il pentamidine (Rhalem et al., 1999), la spiramicina in combinazione col metronidazolo (Pennisi et al., 2005) la marbofloxacin (Rougier et al., 2008), l'enrofloxacin (Bianciardi et al., 2004) e il domperidone (Gómez-Ochoa et al., 2009).

Composti dell'antimonio pentavalente- I composti dell'antimonio pentavalente al momento non sono ancora stati approvati dalla FDA per la somministrazione nel cane. N-metil –glucamine (meglumine) antimoniato è il più comune composto dell'antimonio utilizzato per il trattamento della leishmaniosi nel'uomo e nel cane. Il farmaco inibisce selettivamente la glicolisi degli amastigoti e l'ossidazione degli acidi grassi. Nell'uomo il 95% circa dei casi trattati con meglumine antimoniato ottengono la guarigione clinica e parassitologica (Gradoni et al., 1991; 1995). Nel cane invece questo farmaco ha una breve emivita: e da 6 a 9 ore dopo la somministrazione dall'80% al 95% del meglumine antimoniato è eliminato attraverso i reni (Tassi et al. 1994; Valladares et al., 1996). La maggior parte degli studi condotti nel cane hanno dimostrato una buona efficacia clinica del farmaco. Durante il trattamento un miglioramento della sintomatologia clinica è apprezzabile già dopo una o più settimane dall'inizio del trattamento assieme ad un progressivo rientro dei valori ematologici e biochimici. Nonostante questo il ristabilirsi dei valori dell'elettroforesi delle proteine del siero entro i limiti di normalità può essere lento e solitamente è dose dipendente (Amusatogui et al. 1998). Molti autori hanno descritto che la terapia con meglumine antimoniato non risulta in una totale eliminazione dei parassiti di *Leishmania* dai cani infetti (Ikeda-Garcia et al.,2007, Oliva et al.,

1998). I parassiti infatti possono ancora essere riscontrati nei tessuti di cani clinicamente guariti qualche mese dopo il trattamento (Ikeda-Garcia et al., 2007, Oliva et al., 1998). La ricaduta clinica si manifesta in un periodo compreso da un mese ai due anni dopo la terapia e sono più comuni quando la durata del trattamento è più breve di quattro settimane. Il trattamento con i composti dell'antimoniato inducono una riduzione generalizzata del carico parassitario, accompagnata da un recupero della risposta immunitaria cellulo-mediata (Bourdoiseau et al., 1997) e ad una riduzione del titolo degli anticorpi specifici (Amusatégui et al. 1998). Effetti avversi più comuni nella somministrazione dei composti dell'antimonio sono la tumefazione e il dolore nel punto di inoculazione, ma sono state riportate anche febbre e diarrea e perdita di appetito (Slappendel et al 1998; Denerolle et al., 1999). Il regime di trattamento più comunemente utilizzato è di 100mg/kg una volta al giorno per 4 settimane. Considerando la farmacocinetica dei composti dell'antimonio è preferibile somministrare 2 dosi giornaliere di 50mg/kg (Tassi et al. 1994). Sono stati descritti forme di resistenza al trattamento con gli antimonati di alcuni ceppi di *Leishmania* (Gramiccia et al., 1992). Una formulazione liposimale di composti dell'antimonio è stata recentemente testata dimostrando buona efficacia (Valladares et al., 1996), ma non è ancora disponibile in commercio.

Allopurinolo- L'allopurinolo è un farmaco approvato dall'FDA per il trattamento nel cane. L'allopurinolo è un analogo strutturale dell' ipoxantina ed è in grado di inibire l'attività della xantina ossidasi, un enzima che catalizza la produzione di xantina a partire dall'ipoxantina e che ossida poi la xantina in acido urico. La sua attività anti *Leishmania* è attribuita all'impossibilità di sintetizzare purine da parte del protozoo che è costretto a procurarsele dall'ospite. Nell'uomo l'allopurinolo ha dimostrato scarsa efficacia nel trattamento contro la leishmaniosi se usato in monoterapia. Nei pazienti trattati con antimoniali la combinazione con allopurinolo consente di diminuire la dose dei composti dell'antimonio (Di Martino et al., 1990). Somministrato nel cane come monoterapia per un periodo di almeno due-tre mesi l'allopurinolo comporta un moderato miglioramento della sintomatologia clinica e un parziale rientro di alcuni valori analitici nei limiti di riferimento (Martínez-Subiela et al., 200; Sasanelli et al.2007; Vercammen et al., 2002). Neanche il trattamento con l'allopurinolo comporta la totale eliminazione dei parassiti e la ricaduta si presenta quando il trattamento viene interrotto. Per questi motivi l'allopurinolo viene somministrato per periodi di diversi mesi (Pennisi et al., 2005) anche perché è un farmaco altamente tollerato nel cane e sembra ritardare il

deterioramento della funzione renale in casi di proteinuria senza insufficienza renale (Plevraki et al, 2006). I dosaggi più comunemente prescritti sono tra i 5 e i 20 mg/kg PO ogni 12 ore per 2-24 mesi.

La combinazione di allopurinolo e meglumine antimoniato è il trattamento più comune per la CanL e anche se non risulta in una guarigione parassitologica è in grado di determinare nei cani un periodo più lungo di remissione dei sintomi in confronto ai due farmaci usati in monoterapia (Denerolle et al., 1999). Il trattamento più comune è 100 mg/kg di antimoniato SC una volta al giorno in combinazione con 10 mg/kg di allopurinolo somministrato per OS due volte al giorno per diversi mesi. Gli effetti indesiderati dei farmaci usati in combinazione sono gli stessi dei farmaci in monoterapia.

Aminosidina- L'aminosidina, anche chiamata paramomicina e un aminoglicoside che possiede attività antimicrobiche e antiprotozoarie. L'attività dell'aminosidina è legata alla ridotta associazione delle sub-unità ribosomali nell'amastigote ed è in grado di produrre una disfunzione respiratoria nei promastigoti (Sundar et al 2002; Davidson et al., 2009). L'aminosidina è stata utilizzata con successo nell'uomo come trattamento della leishmaniosi determinando la guarigione parassitologica nel 95% dei

casi. Nel cane la molecola viene utilizzata de sola (5mg/kg SC ogni 24 ore per tre settimane) e in associazione con antimoniato (60 mg/kg IM ogni 12 ore per 4 settimane). La combinazione dei farmaci permette di ottenere migliori risultati sia dal punto di vista clinico che parassitologico rispetto all'utilizzo in monoterapia (Oliva et al., 1998). Una severa limitazione alla limitazione dell'uso di questa molecola sono la sua tossicità renale e vestibolare (Oliva et al., 1998).

Amfotericina B- L'amfotericina B è un farmaco approvato per l'utilizzo ne cane dalla FDA. La molecola è un poliene che interagisce con gli steroli delle membrane cellulari e con l'ergosterolo in particolare, componente abbondante delle membrane di funghi e molti protozoi tra cui *Leishmania*. Inoltre l'amfotericina B è in grado di sequestrare il colesterolo delle membrane cellulari nei macrofagi. Questa modificazione della superficie del macrofago impedisce al parassita l'ingresso nella sua cellula ospite d'elezione (Chattopadhyay, 2011). L'amfotericina B è considerata il farmaco più efficace contro la leishmaniosi viscerale nell'uomo (Davidson et al., 1998). Il costo elevato ne limita l'utilizzo nei paesi in via di sviluppo. Un altro fattore limitante l'uso dell'amfotericina B e la sua tossicità e gli effetti avversi a cui è stata associata tra cui la diminuzione della funzionalità renale,

piressia, vomito e anoressia. Nel cane l'amfotericina B viene somministrata IV diluita in soluzione fisiologica ed emulsificata con olio di soya (Cortadellas et al., 2003), nonostante questa preparazione si sia dimostrata molto efficace nella guarigione clinica non viene utilizzata nella routine per la complessità della sua preparazione. Inoltre la guarigione clinica che si ottiene in un breve periodo è seguita immancabilmente dalla ricaduta. Dagli anni novanta , inoltre, è disponibile una formulazione liposomale dell'amfotericina B altamente efficace e molto meno tossica delle formulazioni convenzionali. Per evitare lo sviluppo di ceppi di *Leishmania* amfotericina B-resistenti la World Health Organization ha scoraggiato l'uso di questa molecola nel trattamento del cane.

Miltefosine- Il miltefosine è un alchilofosfocolina non approvato dalla FDA per l'uso in cani con leishmaniosi. La molecola è stata sviluppata come antitumorale nell'uomo ed in seguito utilizzata come rimedio per la leishmaniosi. L'attività del farmaco è da attribuire all'interferenza con le cascate segnale del parassita e con la sintesi della membrana plasmatica che causano la morte del parassita (Croft et al., 1987). Nell'uomo determina una rapida guarigione clinica accompagnata da una guarigione parassitologica in più del il 90% dei casi. Il miltefosine è stato recentemente registrato per la

somministrazione orale nel cane in diversi paesi Europei. Alcuni studi condotti nel cane riportano l'efficacia del miltefosine nel trattamento della leishmaniosi somministrato da solo (2mg/kg ogni 24 ore per 4 settimane) o in combinazione con l'allopurinolo (10 mg/kg ogni 24 ore per diversi mesi). Come tutti gli altri farmaci anti-*Leishmania* usati nel cane il miltefosine non è in grado di indurre una guarigione parassitologica completa anche se una riduzione drastica e progressiva è stata ben documentata (Manna et al.,2009; Mateo et al., 2009). Nonostante l'efficacia della guarigione clinica indotta, il miltefosine, da solo no è sufficiente a prevenire ricadute. L'associazione con l'allopurinolo invece presenta la stessa efficacia parassitologica e clinica dell'associazione con l'antimoniato senza che sia stata documentata alcuna ricaduta o grave effetto avverso durante un follow up di 7 mesi (Mirò et al.,2008). Gli unici effetti collaterali riscontrati sono diarrea e vomito in forme autolimitanti. È ancora da documentare se l'utilizzo del miltefosine nel cane possa portare allo sviluppo di ceppi di *Leishmania* resistenti al farmaco.

Pentamidina- La pentamidina (approvata FDA per l'uso nel cane) è una diamidina aromatica il cui preciso meccanismo d'azione no è stato ancora completamente chiarito. Si pensa che l'azione leishmanicida possa essere

mediata tramite l'influenza sulla biosintesi delle poliamine e sul potenziale di membrana mitocondriale (Rhalem et al., 1999). La pentamidina veniva utilizzata come trattamento di seconda linea nei casi di ceppi antimonio-resistenti. Il suo utilizzo è stato limitato e poi abbandonato per via del costo, dei pesanti effetti avversi tra cui l'induzione di diabete mellito, e la scarsa efficacia (attorno al 70%). La pentamidina è stata usata nel trattamento della CanL negli anni '80 e poi abbandonata a causa dei gravi effetti avversi del trattamento quali vomito, diarrea, ipersalivazione ipotensione e shock anafilattico (Rhalem et al., 1999)

Combinazione spiramicina e metronidazolo- Il metronidazolo ma non la spiramicina sono approvati dalla FDA per il trattamento nel cane. Per via dell'attività anti-*Leishmania* del metronidazolo in vitro alcuni ricercatori hanno proposto l'associazione con la spiramicina. Il trattamento con associazione spiramicina (150.000 U/kg PO ogni 24 ore) e metronidazolo (25 mg/kg PO ogni 24 ore) è stato comparato con il trattamento allopurinolo e antimonio in cani infetti (Pennisi et al., 2005) e non è stata dimostrata alcuna disparità nei risultati clinici dei due tipi di trattamento.

Marbofloxacin- La marbofloxacin è un fluorochinolone di terza generazione sviluppato per uso veterinario. La molecole agisce inibendo la DNA girasi batterica (Vouldoukis et al., 2006) ed è molto efficace contro un gran numero di gram-positivi e gram-negativi. I tripanosomatidi hanno una struttura genomica più vicina ai batteri che agli eucarioti. Inoltre sembra che eserciti anche un effetto leishmanicida indiretto attraverso il TNF e la via dell'NO sintatasi (Cavaliero et al., 1999). Alcuni trial clinici documentano che la marbofloxacin somministrata a dosaggi di 2 mg/kg PO ogni 24 ore sono in grado di indurre un miglioramento della sintomatologia nella CanL (Rougier et al., 2008)

Enrofloxacin- L'enrofloxacin è un farmaco registrato per l'utilizzo nel cane. È un fluorochinolone che ha la capacità di stimolare l'attività microbica dei macrofagi attraverso la produzione dell'NO (Bianciardi et al., 2004). L'attività dell'enrofloxacin da sola o in associazione con il metronidazolo induce un miglioramento della sintomatologia clinica solo parziale e di breve durata.

Domperidone-il domperidone è un'agonista del recettore della dopamina con attività pro cinetica gastrica e antiemetica. L'effetto antidopaminergico

risulta nel rilascio di serotonina che a sua volta stimola la secrezione di prolattina (Berczi et al., 2000). La prolattina è stata classificata come una citochina pro-infiammatoria derivante dai linfociti, ma come questo possa mediare un effetto anti *Leishmania* non è conosciuto (Hinterberger-Fischer et al.2000). Studi recenti (Gómez-Ochoa et al., 2009) hanno dimostrato l'efficacia del trattamento con domperidone (1mg/kg ogni 12 ore per 4 settimane) nel ridurre la sintomatologia e il titolo degli anticorpi specifici della CanL senza che siano stati documentati effetti collaterali.

3.6 L'immunoterapia

L'immunoterapia comprende l'utilizzo di composti biologici per modificare o modulare la risposta immunitaria con lo scopo di ottenere un effetto profilattico o terapeutico. Le basi dell'immunoterapia si fondano sulle capacità intrinseche del sistema immunitario di difendere l'organismo contro una varietà di malattie. L'instaurarsi di una malattia è considerato quindi la conseguenza di un fallimento, o di una risposta subottimale o eccessiva del sistema immune che può essere risolta con l'intervento di sostanze immunomodulatorie. Gli agenti immunoterapici possono esercitare

un effetto aumentando direttamente o indirettamente le difese naturali dell'ospite in modo da rinforzare una funzione effettrice debole o contenere una risposta eccessiva e deleteria (Oldham, 2006). L'uso di composti chimici e biologici atti a modulare la risposta immunitaria e' sotto indagine da più di trent'anni con esito positivo riguardo diversi composti di origine chimica, virale e batterica nei modelli animali, ma non nell'uomo (Oldham et al. 1983). La crescita negli anni recenti delle tecniche di manipolazione genetica hanno permesso di produrre composti biologici altamente purificati. Questi prodotti biologici sono stati testati in modelli preclinici e in trial clinici in alcune specie animali e nell'uomo (Oldham et al. 1983) per il trattamento di diverse malattie incluso il cancro (Koenecke et al. 2008, Fujii et al., 2009), le allergie (Niederberger et al., 2009) e il virus dell'epatite C (Batdelger et al., 2008).

Nel tentativo di evitare o almeno di ridurre gli effetti collaterali associati all'uso della chemioterapia tradizionale nel trattamento della leishmaniosi sono stati fatti numerosi studi sull'immunoterapia o dell'immunoterapia in associazione alla chemioterapia. I vaccini di prima generazione, prodotti principalmente a partire da promastigoti inattivati con o senza adiuvanti, che non hanno avuto successo nella prevenzione della malattia sono stati invece studiati per comprovare l'efficacia terapeutica (Ghalib et al., 2007).

L'utilizzo di una preparazione trivalente di *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* è stata valutata in Ecuador e si è dimostrata efficace nel curare le forme cutanee di leishmaniosi (Iraji et al., 2005; Berman, 1988). La combinazione di una formulazione di parassiti uccisi di *L. Amazonensis* con un regime a meta` dose di antimoniali si è dimostrata anch'essa molto efficace nel trattamento della leishmaniosi cutanea (Faghihi et al., 2003). La stessa preparazione modificata con l'aggiunta dell'adiuvante BCG (*Bacillus Calmette Guerin*) è stata utilizzata con successo per risolvere un caso refrattario di leishmaniosi muco-cutanea (Herwaldt et al., 1992). Si ipotizza che l'efficacia delle preparazioni a base di parassiti inattivati consista nell'attivazione delle DCs, cellule in grado di guidare a loro volta l'attivazione dei linfociti T effettori. Nonostante il trattamento con parassiti uccisi abbia dimostrato un effetto inferiore alla chemioterapia convenzionale, i risultati ottenuti sono interessanti perché aprono la possibilità dell'utilizzo dell'immunoterapia nei casi di controindicazione, sensibilità o intollerabilità dei farmaci convenzionali (Mayrink et al. 1992). Inoltre l'utilizzo di una terapia combinata con parassiti uccisi si è dimostrata in grado di migliorare le possibilità della risoluzione favorevole della malattia e di diminuire l'incidenza delle ricadute associate alla chemioterapia.

Diversi studi, condotti principalmente sul modello murino e sui primati, hanno dimostrato l'efficacia dei vaccini a DNA nell'indurre una risposta umorale e cellulare contro la leishmaniosi cutanea (Gurunathan et al, 2000; Bhowmick et al., 2008). I vaccini a DNA sono relativamente facili da produrre, somministrare e nelle condizioni appropriate sono altamente immunogeni. L'immunogenicità dei vaccini a DNA è da attribuire a diversi fattori, il più importante probabilmente è la capacità di esprimere proteine antigeniche correttamente ripiegate e strutturalmente simili alle proteine native (Gurunathan et al, 2000; Bhowmick et al., 2008) nel contesto delle APC specializzate e non. Come risultato questi vaccini sono in grado di stimolare una forte risposta T-cellulo mediata (sia CD8+ che CD4+) e anticorpale (Robinson et al, 2000). La prevalenza dell'una o dell'altra risposta possono essere modulate con l'aggiunta di sequenze oligonucleotidiche CpG e di citochine (Iwasaki et al., 1997; Geissler et al., 1997). L'idea che l'immunizzazione con il DNA possa modulare la risposta umorale non protettiva che sottende alla malattia nasce da alcuni risultati ottenuti nel topo. La vaccinazione con DNA codificante antigeni protettivi infatti è in grado di proteggere topi altamente suscettibile quali i BALB/c contro il challenge virulento (Xu et al., 1995; Ahmed et al., 2008) con L. Major (Handman et al., 2000). Questo effetto protettivo è stato

attribuito ad uno shift da un profilo citochinico associato ad una risposta immunitaria Th2, verso un profilo citochinico Th1 che promuove una risposta cellulare efficace nel risolvere la malattia (Handman et al., 2000). Infatti nel topo, come è stato dimostrato in seguito nell'uomo e anche nel cane la resistenza alla malattia è stata associata ad una attivazione dei linfociti Th1 che esprimono IFN γ e IL-12, mentre la condizione di malattia è stata associata all'espansione delle sottopopolazioni Th2 che secernono IL-4 e dei Tregs che esprimono IL-10 (Belkaid et al., 2002; 2003). In linea con questo il trattamento di topi BALB/c con IL-12 oppure con anticorpi neutralizzanti IL-4 è in grado di revertire la condizione di malattia e determinare un controllo del parassita (Uzonna et al., 2001). La guarigione è ottenuta nel trattamento durante le fasi iniziali della malattia o prima dell'infezione, non nello stato di malattia avanzato dove una risposta di tipo Th2 si è già stabilita. Inoltre la IL-12 ricombinante si è dimostrata molto efficace utilizzata come adiuvante nel modello murino, ma non nei primati (Heinzel et al., 1993). Nonostante il IFN γ sia importante nel guidare il differenziamento delle cellule Th1 non è in grado da solo di promuovere la risposta Th1 o di sopprimere una risposta Th2 in vivo. Infatti la terapia continuativa con IFN γ ha un effetto molto ridotto sull'esito della malattia indotta da *L. major* nei topi BALB/c (Sadick et al., 1990). Altri studi si sono

concentrati sull'utilizzo di anticorpi anti IL-10 dimostrando un'effetto leishamniostatico in topi IFN γ knock-out (Murray et al, 2003). Inoltre la contemporanea somministrazione di anticorpi anti IL-10 con antimoniali permette un aumento della cinetica leishmanicida del chemioterapico con una diminuzione delle dosi di dieci volte e una riduzione dei tempi della terapia (Murray et al, 2005). Nonostante le citochine si siano dimostrate molto promettenti come agenti immunoterapeutici il loro utilizzo è stato associato a pesanti effetti collaterali che possono ingigantirsi con l'aumento delle dosi. Inoltre le citochine hanno un'emivita molto breve rendendo necessaria una somministrazione multipla con conseguente potenziale incremento degli effetti collaterali.

Alcuni vaccini costituiti da subunità sono in grado di modulare l'esito della leishmaniosi viscerale. L'antigene fucose-mannose ligand purificato e somministrato come vaccino si è dimostrato capace di causare una riduzione della carica parassitaria epatica in topi infettati con *L.donovani* in associazione ad una diminuzione dei livelli di IL-10 (Santos et al., 2003). Risultati simili sono stati ottenuti nel cane utilizzando lo stesso antigene in una formulazione con saponina, il vaccino Leishmune® (Santos et al.,

2007) . Un cocktail di antigeni purificati (thiol-specific antioxidant protein (TSA), stress inducible protein di *L. major* (LmST11), *Leishmania* elongation initiation factor (LeIF) e la proteina ricombinante di *Leishmania braziliensis* heat-shock protein 83 (rLbhsp83) e' stato utilizzato con successo per curare un caso di leishmaniosi mucocutanea refrattaria nell'uomo, mentre un polisaccaride prodotto da *Mycobacterium* e inoculato insieme a glucantime ha portato alla guarigione il 100% dei pazienti affetti da CL (Barroso et al., 2007). Nonostante le basi immunologiche e il meccanismo alla base dell'effetto terapeutico dei vaccini a subunita` sia sconosciuto, i dati clinici supportano il potenziale di questo tipo di vaccini come agenti immunoterapeutici contro la leishmaniosi.

Capitolo 4

I Vaccini

Nel 1996 Dye ha proposto un modello matematico per il controllo della leishmaniosi. questo modello compara i vari metodi di controllo per la riduzione dell'incidenza nella popolazione umana e canina della malattia. In accordo con questo modello e considerando l'incidenza nel cane, l'abbattimento dei cani infetti risulta essere la strategia meno efficace, mentre l'approccio terapeutico dei cani, anche solo di quelli infetti dovrebbe ottenere risultati migliori. La vaccinazione dei cani dovrebbe avere un impatto ancora più ampio, per le sue proprietà profilattiche e soprattutto se aggiunto ai trattamenti antiparassitari. Per conseguire successo nel controllo dell'incidenza della malattia nell'uomo, il metodo dell' abbattimento dei cani è stimato essere come l'approccio meno efficace. L'immunizzazione dell'uomo inoltre risulterebbe meno efficace dell'immunizzazione nel cane perché non avrebbe nessun impatto nelle dinamiche d'infezione della popolazione canina.

4.1 Vaccini per la profilassi della leishmaniosi nell'uomo

Nonostante i casi di leishmaniosi dell'uomo siano stimati intorno ai 500.000 con 50.000 morti all'anno (WHO, 2011), la leishmaniosi viscerale (VL) nell'uomo non ha mai suscitato interesse per l'industria dei vaccini. Nonostante dopo la malaria sia la seconda malattia parassitaria per mortalità, e quarta per morbilità (Mathers et al., 2007), la leishmaniosi viscerale o kala-azar è una malattia negletta, che riguarda principalmente i poveri. La più antica metodica di vaccinazione, vecchia di un secolo, è la pratica della leishmanizzazione che consiste nell'infezione di persone naive con la specie virulenta di *Leishmania major*. Questo vaccino difeso da alcuni autori per proteggere contro le forme tegumentarie di leishmaniosi (Khamesipour et al., 2006), è ormai andata in disuso per via delle lesioni permanenti che il ceppo vaccinale può causare. In seguito alcuni vaccini di prima generazione, costituiti dal parassita intero inattivato sono stati sviluppati e testati contro la leishmaniosi cutanea (CL) e la VL, ma la loro efficacia clinica, calcolata intorno al 54%, è stata considerata bassa. Un unico prodotto, Leish-111f, una proteina di fusione di tre antigeni conservati di *L. major* formulato con MPL-SE sta entrando nella fase II del test clinico nell'uomo, incluso nel trial come vaccino terapeutico per la VL (Coler and Reed, 2005; Nascimento et al.,

2010). Al momento nessun prodotto è stato ancora registrato come vaccino per la profilassi nell'uomo della VL.

4.2 Vaccini per la profilassi della leishmaniosi nel cane

Sono stati identificati numerosi antigeni di *Leishmania* come potenziali candidati contro la CanL (Palatnik-de- Sousa, 2008), ma molto pochi sono arrivati ad essere testati sul campo. I vaccini di prima generazione sviluppati per l'uomo sono stati testati anche sul cane.

4.2.1 Vaccini di prima generazione

I vaccini di prima generazione hanno sostituito la pratica della leishmanizzazione e comprendono i vaccini uccisi, le cui prime formulazioni risalgono agli anni '40 e i vaccini vivi attenuati. I tentativi di ottenere ceppi attenuati di *Leishmania* includono la coltivazione in vitro per lunghi periodi (Kedzierski et al., 2006), utilizzo di ceppi termo-sensibili (Gorczynski et al., 1985), irradiazione con raggi γ (Rivier et al., 1993), la mutagenesi chimica (Kimsey et al., 1993) o la coltivazione sotto pressione della gentamicina (Daneshvar et al., 2003). Queste metodiche puntavano alla produzione di mutazioni genetiche che attenuassero la patogenicità del

protozoo. Oggi con le tecniche di manipolazione genetica è possibile eliminare geni coinvolti nelle patogenicità di *Leishmania*, e con queste tecniche sono stati prodotti diversi ceppi difettivi che sono candidati interessanti per il futuro sviluppo di un vaccino (Titus et al, 1995; Veras et al 1999, Amaral et al., 2002). Con le stesse tecniche sono stati prodotti ceppi con cassette suicide incluse nel genoma sensibili ad alcuni farmaci (Muyombwe et al., 1998). Le limitazioni di questi tipi vaccini sono legati alla possibile reversione di virulenza e alle difficoltà di produzione su larga scala. I primi studi sulla comparazione delle varie preparazioni vaccinali, sono stati condotti senza challenge e hanno dimostrato che i vaccini ottenuti da lisato di promastigoti di *L. major* adiuvati con BCG sono in grado di determinare una risposta linfoproliferativa in vitro nel cane, mentre quelli adiuvati con saponina determinano prevalentemente una risposta umorale. In seguito Mayrink (2006) e il suo gruppo hanno dimostrato che una formulazione di *Leishmania braziliensis* lisata assieme a BCG, che nell'uomo è risultato essere protettivo intorno al 50% (Antunes et al., 1986) contro le infezioni del tegumento, nel cane arriva ad essere protettiva fino al 90% nell'infezione sperimentale. Questa formulazione in seguito ha fallito nella fase III, la prova di campo dove nessuna differenza significativa è stata rilevata tra i vaccini e i placebo. La differenza tra il challenge naturale e

artificiale probabilmente è responsabile del fallimento del vaccino nelle prove di campo.

4.2.2 Vaccini di seconda generazione

I vaccini di seconda generazione includono vaccini a subunità costituiti da proteine sintetiche o ricombinanti, batteri o virus ricombinanti che esprimono antigeni di *Leishmania* (Yang et al., 1990; Gurunathan et al., 1997) o frazioni native purificate dai parassiti. Molte proteine di *Leishmania* sono state candidate come antigeni e scelte in base alla loro abbondanza e localizzazione sulla superficie (Handman et al., 1986), cloni di linfociti T, screening di pool antigenici (Melby et al., 2000) e screening di librerie d'espressione con sieri reattivi (Skeiky et al., 1995 Reed et al., 1987). Questi antigeni includono la glicoproteina 63 (gp63), la glicoproteina di membrana 46 (gp 46 o M-2), fucose- mannose ligand (FML), *Leishmania* homolog of receptors for activated C kinase (p36/LACK), NH36, Protein Q chimera, cistein proteasi A e B, GRP78, antigeni LD1, hydrophilic acylated surface protein B1 (HASP B1), LCR1, proteina salivare 15 (SP15), antigene superficiale di promastigote 2 (PSA-2), istone H1, MML, *Leishmania*

elongation and initiation factor (LeIF), L. major homolog of the eukaryotic stress inducible protein-1 (LmSTI1), L. major omologo di eukaryotic thiolspecific-antioxidant (TSA) and Leish-111f.

Il primo trial in fase III di un vaccino di seconda generazione, costituito da un liofilizzato proteico semipurificato di *L. infantum*, e' risultato fallimentare (Dunan et al., 1989) nonostante si fosse dimostrato efficace nel modello murino. Un'altro vaccino di seconda generazione sviluppato successivamente ha dimostrato efficacia in trial clinici di campo nel cane: il fucose-mannose ligand (FML) adiuvato con saponina derivante da *Quillaja saponaria* (Leishmune®; da Silva et al., 2001; Borja-Cabrera et al., 2002; Palatnik-de-Sousa et al., 2008). Nel 2003 il vaccino FML-saponina e' stato registrato per la profilassi contro la CanL in Brasile col nome di Leishmune®, e viene usato in Brasile sin dal 2004 e ha ottenuto la sua licenza definitiva nell'ottobre del 2011. Il FML si e' dimostrato antigenico nell'uomo (Palatnik-de-Sousa et al., 1995) e nel cane (Borja-Cabrera et al., 1999) e la formulazione di Leishmune® si e' dimostrata essere immunogenica, immunoprofilattica e immunoterapeutica nel topo, nella cavia e nei trial di campo nel cane con dati di 92% di protezione e 72% di efficacia (Palatnik-de-Sousa et al., 1994; Santos et al., 2002, 2003, 2007; Borja-Cabrera et al., 2004, 2008, 2010). La protezione conferita da

Leishmune® è duratura almeno 3.5 anni ed è stata concomitante ad una riduzione dell'incidenza della malattia nell'uomo nella regione (Borja-Cabrera et al., 2002). La vaccinazione oltre ad essersi dimostrata protettiva riduce il carico parassitario accessibile per i flebotomi come dimostrato dai risultati negativi delle PCR per il DNA di *Leishmania* da campioni di sangue e linfonodo e dalle reazioni negative della all'immunoistochimica (Nogueira et al., 2005). Gli anticorpi anti-FML indotti dalla vaccinazione con Leishmune® prevalentemente di tipo IgG2 (Mendes et al., 2003) e sembrano responsabili di un blocco della trasmissione della malattia dai flebotomi nelle prove di campo (Palatnik-de-Sousa et al., 2008). La risposta IgG2 anti-FML inoltre non è sieroreattiva nei confronti dei test ufficiali usati per lo screening in Brasile, permettendo quindi di distinguere gli animali vaccinati dagli animali infetti (Palatnik-de-Sousa et al., 2009)

Leishmune® è stato studiato anche in immunoterapia utilizzando una formulazione arricchita di saponina, dimostrando una riduzione della sintomatologia, dei decessi, e del numero dei parassiti nei linfonodi. La terapia integrata di allopurinolo, amphotericina B e Leishmune® promuove una guarigione sterile, convertendo i risultati delle PCR per il DNA di *Leishmania* in negativi (Borja-Cabrera et al., 2010).

Tra il 2004 ed il 2006 sono stati condotti degli studi sull'incidenza della leishmaniosi nell'uomo in due regioni del Brasile dove la popolazione canina è stata sottoposta ad una campagna di vaccinazione con Leishmune®. La diminuzione dell'abbattimento dei cani e dell'incidenza nella popolazione umana è stata correlata significativamente con l'incremento degli animali vaccinati indicando che l'impatto profilattico del vaccino oltre ad una diminuzione delle infezioni sia nella popolazione umana che canina ha comportato una diminuzione dei cani sacrificati (Palatnik-de-Sousa et al., 2009). In particolare nella regione di Araçatuba una diminuzione dell'incidenza nei cani del 25% ha avuto un riflesso del 61% nella diminuzione della malattia nella popolazione umana (Palatnik-de-Sousa et al., 2009).

Tra le altre formulazioni registrate esiste il vaccino chiamato Leish-Tec® che è stato registrato in Brasile. È composto dall'antigene A2 purificato da amastigoti di *Leishmania* e adiuvato con saponina. Di questo vaccino esiste unicamente uno studio sperimentale condotto nel cane (Fernandes et al., 2008).

In Europa, una formulazione a base di LiESAp è stata registrata per la commercializzazione con il nome di CaniLeish® nel 2011 ed è stata lanciata in Portogallo, Spagna, Francia, Grecia e in Italia. Si tratta di un

antigene peptidico composto da proteine Excreted–Secreted di *L. Infantum* con QA21 da *Q. Saponaria* come adiuvante (Virbac, 2011)

La capacità di un vaccino di rispondere ad antigeni multipli è una delle caratteristiche essenziali della sua efficacia. Numerosi antigeni sono inclusi nelle preparazioni vaccinali di prima generazione o in quelli di seconda generazione come Leishmune® or LiESAp (Lemesre et al., 2007; Palatnik-de-Sousa et al., 2008) che hanno già dimostrato una grande efficacia nelle prove di campo. Nonostante questo, per l'industria produrre dei vaccini a partire dai protozoi presenta delle difficoltà. Far crescere i protozoi ed estrarre le loro proteine native è laborioso, dispendioso e necessita l'utilizzo di prodotti di origine bovina che sono stati proibiti a seguito dell'emergenza delle encefalopatie spongiformi. Una soluzione a questi problemi è rappresentata dai vaccini a subunità, sviluppati numerosi a partire dagli antigeni di *Leishmania* e disponibili nella forma ricombinante (Palatnik-de-Sousa et al., 2008; Working Group on Research Priorities for Development of Leishmaniasis Vaccines et al., 2011). Questi antigeni sono interessanti nell'ottica di un vaccino ricombinante multiplo contro la CanL. I candidati più promettenti sono LACK, LeIF, TSA, LmSTI1, H1, Cpa + CPb, KMP11, and NH36 , di questi però nessuno ha raggiunto la fase tre di trial nel cane.

La proteina di fusione Leish-111f contenente gli antigeni TSA, LmST1 e LeIF in una formulazione contenente MPL-SE o Adjuprime si è dimostrata immunogena in cani nel challenge con *L. chagasi*. e *L. infantum* (Fujiwara et al., 2005; Moreno et al., 2007) ma non si è dimostrata efficace nel prevenire l'infezione naturale o la progressione della malattia nelle prove di campo (Gradoni et al., 2005). Comunque Leish-111f somministrato assieme a glucantime risulta efficace nel trattamento della CanL (Miret et al., 2008).

4.2.3 Vaccini di terza generazione

In confronto ai vaccini ricombinanti a base di proteine i vaccini a DNA risultano essere molto più stabili ed hanno un costo di produzione molto più basso, non hanno bisogno della catena del freddo per la distribuzione e sono flessibili alla combinazione di geni multipli in un unico costrutto. Negli ultimi anni c'è stato molto interesse nella produzione di questo tipo di vaccini contro la leishmaniosi che sono in via di sperimentazione in diversi modelli animali (Palatnik-de-Sousa, 2008). Gli antigeni LACK, LeIF, TSA, LmSTI1, H1, CpA + CpB, KMP11, and NH36 sembrano essere gli antigeni più interessanti che hanno già dato buoni risultati nel modello animale (Palatnik-de-Sousa, 2008). Recentemente un antigene del complesso FML,

una nucleoside idrolasi di 36 kDa (NH36), si e' dimostrata capace di riprodurre gli effetti di Leishmune® nel topo, sia nella forma ricombinante che clonata in un vaccino a DNA (Aguilar-Be et al., 2005). La protezione del vaccino a DNA nel topo e' superiore a quella conferita dall'antigene ricombinante NH36 o di FML+saponina, e questo e' attribuito alla proliferazione delle cellule T CD4+ secernenti IFN γ , che sono caratteristiche della risposta immunitaria Th1 (Aguilar-Be et al., 2005). Lo stesso vaccino ha dimostrato efficacia contro la CanL nelle prove di campo (Borja-Cabrera et al., 2009, 2012) e nell'immunoterapia, migliorando la sintomatologia clinica di cani con forme gravi della malattia (Borja-Cabrera et al., 2012)

4.3 I vaccini a DNA

4.3.1 Come nascono i vaccini a DNA

Nel 1990 Wolff et al. hanno mostrato come l'iniezione di un gene reporter codificante la lattasi nel muscolo quadricipite del topo sia in grado di indurre l'espressione sostenuta della proteina. Successivamente Tang et al. (1992) inoculando nella cute del topo plasmidi codificanti l'ormone della crescita

umano riuscirono a dimostrare che il sistema immunitario produce una risposta immunitaria contro la proteina espressa, imitando l'azione di un vaccino proteico. La prova definitiva che il DNA codificante un antigene può suscitare una risposta vaccinale protettiva avviene nel 1993 quando Ulmer et al. usano un plasmide codificante la proteina nucleare del virus dell'influenza per vaccinare dei topi che diventano resistenti al challenge virulento.

4.3.2 Caratteristiche dei vaccini a DNA

A differenza dei vaccini convenzionali, costituiti da proteine o polisaccaridi, i vaccini a DNA comprendono plasmidi codificanti l'antigene vaccinale assieme ad un promotore eucariotico forte, utilizzato per guidare l'espressione della proteina (Rajcani et al., 2005). Questi vaccini a base di acidi nucleici possono essere inoculati intramuscolo, a livello sottocutaneo o mucosale con lo scopo di accedere al citoplasma cellulare. In sede citoplasmatica i plasmidi inducono l'espressione dell'antigene in vivo e mimano l'infezione sollevando la risposta immunitaria desiderata. I vaccini a DNA sono stati applicati con successo al modello animale per trattare o prevenire malattie infettive, i tumori, l'autoimmunità e le allergie (Ulmer et al., 1996). La struttura semplice dei vaccini a DNA gli conferisce degli

indiscussi vantaggi rispetto ai vaccini proteici e polisaccaridici. Il semplice clonaggio della sequenza codificante nel vettore plasmidico è un approccio molto più conveniente ed economico rispetto alla coltura ed inattivazione di patogeni infettivi o l'induzione dell'espressione e la conseguente purificazione delle proteine ricombinanti. Inoltre l'espressione in vivo delle proteine permette di mantenere la struttura antigenica della proteina molto più simile a quella nativa, potendo garantire tutte le modificazioni post-traslazionali di base. Le tecniche di manipolazione del DNA in vitro inoltre permettono di introdurre facilmente mutazioni della sequenza codificante rendendo i vaccini plastici e velocemente adattabili alle variazioni che subiscono i ceppi virali. Il DNA plasmidico inoltre è stabile a temperatura ambiente, cosa che rende lo stoccaggio e il trasporto facile ed economico.

I vaccini a DNA hanno il pregio di stimolare la presentazione dell'antigene associato sia agli MHC di classe I che di classe II, inducendo una risposta Th1 o Th2 e attivando sia i linfociti T CD4+ che i CD8+, oltre ai linfociti B (Liu, 2011).

Ad oggi sono stati approvati dei vaccini a DNA ad uso veterinario per l'uso nei pesci contro il virus delle necrosi ematopoietica infettiva, contro il melanoma nel cane, contro il virus West Nile nel cavallo e nel suino per il rilascio dell'ormone della crescita (Kutzler and Weiner, 2008). Questo

successo nell'applicazione veterinaria non si è tradotto in medicina umana, rimanendo la scarsa immunogenicità il vero tallone d'Achille dei vaccini a DNA nel paziente umano.

4.3.3 Il meccanismo dei vaccini a DNA

Il preciso meccanismo attraverso il quale i vaccini a DNA riescano a indurre una risposta immunitaria efficiente non sono ancora completamente chiariti. I vaccini a DNA infatti riescono a funzionare a dosaggi bassissimi, un range compreso tra i picogrammi e i nanogrammi, e la maggior parte delle cellule somatiche transfettate non sono APC. Probabilmente le basse quantità di DNA che riescono a sostenere un'alta espressione proteica riescono a stimolare l'attivazione del sistema immunitario meglio delle proteine inoculate che hanno breve emivita. Inoltre a spiegare l'immunogenicità di questi vaccini sono stati proposti almeno tre differenti meccanismi. Si pensa infatti che gli antigeni codificati dal plasmide vengano presentati dalle cellule somatiche, principalmente miociti e cheratinociti, nel contesto delle molecole MHC I attivando i linfociti CD8+. L'immunizzazione via DNA inoltre potrebbe risultare anche nella transfezione diretta delle APC o nel fenomeno del cross-priming, che consiste nella fagocitosi delle cellule transfettate da parte delle APC che a loro volta presenterebbero l'antigene

vaccinale alle cellule T. I miociti non sono considerate cellule efficienti nel presentare l'antigene, e per questo si crede e i due ultimi meccanismi siano quelli più efficienti Fig.10.

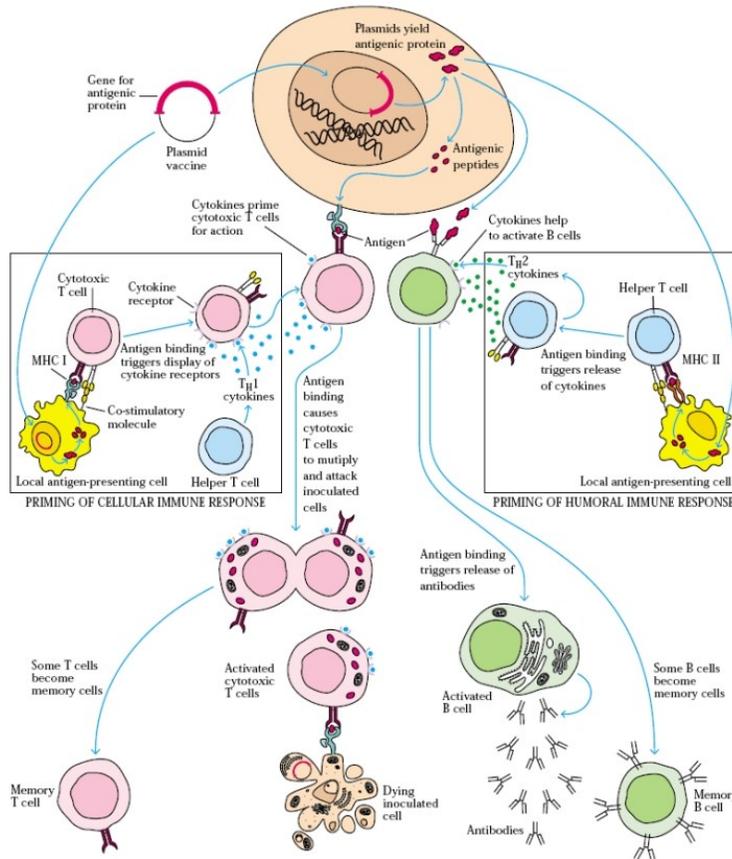


Fig.10: Meccanismo d'azione dei vaccini a DNA (da: <http://wenliang.myweb.uga.edu>)

Elementi immunomodulatori del plasmide come le sequenze CpG non metilate possono sicuramente contribuire all'immunogenicità del DNA. I motivi CpG dinucleotide sono rari nel genoma dei mammiferi o sono quasi sempre metilate, mentre sono caratteristiche del mondo batterico e come tali vengono riconosciute dai recettori dell'immunità innata quali Toll-like receptors (TLR) presenti sulle APC. Le CpG sono infatti riconosciute come pathogen associated molecular pattern (PAMP) dai TLR9 che innescano una cascata di attivazione delle APC. Il meccanismo di attivazione dell'immunità mediato da TLR9 è stato dimostrato essere importante nel vaccino a DNA contro il virus della coriomeningite nel topo (RLCMV; ottembourg et al., 2010). Il meccanismo di attivazione mediato da TLR9 non è l'unico innescato dai vaccini a DNA. Altri studi hanno dimostrato il coinvolgimento della TANK-binding kinase (TBK1), una I κ B chinasi non convenzionale che attiva la cascata di trascrizione dei dei geni dell'interferone tipo I (Sharma et al., 2003). Il DNA citoplasmatico inoltre è in grado di attivare le cascate dell'immunità innata mediati da AIM2 (absent in melanoma 2), STING (stimolatore dei geni IFN) e IRF3 (Barber, 2011; Stetson and Medzhitov, 2006) che potrebbero ulteriormente contribuire all'azione dei vaccini a DNA

Capitolo 5

Scopo del lavoro

Leishmania infantum/chagasi è agente causale della leishmaniosi nel cane, che rappresenta il principale reservoir della malattia, mentre i roditori il gatto e l'uomo rappresentano ospiti accidentali del parassita. Nell'uomo *L. infantum/chagasi* e *L.donovani* sono causa della forma viscerale di leishmaniosi e i cui casi sono stimati intorno ai 500.000 con 50.000 morti all'anno (WHO, 2011). Nonostante questo a tutt'oggi non esiste un vaccino contro la leishmaniosi registrato per l'uomo. La lotta alla malattia nell'uomo e nel cane è condotta tramite l'abbattimento degli animali malati, il trattamento terapeutico dei cani, l'utilizzo di insetticidi e repellenti e solo recentemente attraverso la vaccinazione della popolazione canina.

Nel 1996 Dye ha proposto un modello matematico per il controllo della leishmaniosi. Questo modello compara i vari metodi di controllo per la riduzione dell'incidenza nella popolazione umana e canina della malattia. Questo modello stabilisce che l'intervento deve essere diretto alla popolazione canina, che è coinvolta nella trasmissione della malattia, sia per ridurre l'incidenza della malattia nell'uomo che nel cane. Inoltre, stabilisce che tra i metodi di controllo quello dell'abbattimento degli animali infetti

risulta il meno efficace, anche meno del solo trattamento degli animali malati. Il metodo d'elezione risulta essere quello profilattico portato avanti con i repellenti e soprattutto con la vaccinazione. A conferma di questo modello Palatnik-de-Sousa (2009) dimostra che dopo due anni dalla vaccinazione del 7.5% della popolazione canina si ottiene una diminuzione dell'incidenza nei cani del 25% e del 61% nella popolazione umana. Attualmente sono state registrate tre formulazioni vaccinali per la somministrazione nel cane, e sono tutti vaccini di seconda generazione costituiti da antigeni purificati.

In questo studio è stato sviluppato un nuovo vaccino a DNA che esprime gli antigeni cistein proteinasi b1 (CPb1) e la proteina ribosomale acida PO (LiPO) di *Leishmania infantum*. La scelta di sviluppare un vaccino a DNA deriva principalmente dalla sua capacità di stimolare un'efficace risposta immunitaria sia umorale che cellulo-mediata, e anche per la sua semplicità ed economicità di sviluppo, stoccaggio e trasporto. Gli antigeni Cpb1 e PO sono stati scelti dalla letteratura tra quelli di cui è stata dimostrata la capacità di suscitare in vitro o in vivo una risposta Th1, che è quella considerata efficace per l'eliminazione dei parassiti (Zadeh-Vakili et al. *Vaccine*, 2004; Iborra et al. *Infect Immun.*, 2003).

Il vaccino in questo studio è stato testato non per il suo potenziale profilattico ma per suo potenziale immunoterapeutico su cani naturalmente infetti con forma sintomatica di CanL. Infatti il disegno dell'esperimento in questo caso risulta molto più semplice e il risultato dell'efficienza del vaccino in immunoterapia, quali la sua capacità di produrre uno shift della risposta immunitaria verso il profilo Th1, ci da informazioni utili per poter predirne l'efficacia profilattica. L'immunoterapia inoltre è un'alternativa interessante alla chemioterapia classica già presa in considerazione nell'uomo e molto più raramente nel cane per trattare le forme resistenti di leishmaniosi, sempre più diffuse. Esistono già alcune formulazioni vaccinali che hanno avuto successo nel trattamento della CanL soprattutto se usate in associazione con chemioterapici: la terapia integrata di allopurinolo, amphotericina B e Leishmune®, formulazione di FML arricchito con saponina promuove una guarigione sterile, convertendo i risultati delle PCR per il DNA di *Leishmania* in negativi (Borja-Cabrera et al., 2010).

Il potenziale immunoterapico del vaccino è stato testato su 12 cani affetti da CanL e confrontato con un gruppo di 5 cani ugualmente leishmaniotici e inoculati con il plasmide vuoto. Gli animali sono stati monitorati per 12 mesi attraverso l'esame clinico e di laboratorio e i titoli degli anticorpi specifici sono stati misurati in IFAT. La PCR real-time quantitativa è stata utilizzata

per monitorare i livelli del DNA di *Leishmania* a livello tissutale e l'espressione del mRNA delle citochine relative ai profili Th1 e Th2 dai linfociti del sangue periferico.

Inoltre gli antigeni CPb1 e PO sono stati espressi in forma ricombinante in fusione e utilizzati per allestire un test ELISA, che rappresenta una metodica oggettiva e specifica, con l'indiscusso vantaggio della quantificazione a suo favore.

Capitolo 6

Materiali e metodi

6.1- Terreni e reagenti

Le quantità riportate si riferiscono alla preparazione di un litro di soluzione

PBS 10X:

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g

La soluzione viene portata a pH 7.4.

TBS 1X:

Tris	2.42 g
NaCl	29.24 g

Portare a pH 7.5 con HCl.

TTBS 1X:

Tween-20	0.5 ml
TBS	1 litro

Blocking Solution

Gelatina	30 g
TBS	1 litro

Scaldare a 37°C per sciogliere e conservare in stufa.

Antibody Buffer

Gelatina	10 g
TBS	1 litro

HRP Substrates for Blotting

CN/DAB 10X	10 ml
Stable Peroxide Substrate Buffer	90 ml

Terreno LB liquido:

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
H ₂ O	a volume

La soluzione viene portata a pH 7 con NaOH 5 M.

Terreno LB agar:

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
Agar batteriologico europeo	14 g
H ₂ O	a volume

La soluzione viene portata a pH 7 con NaOH 5 M.

Tampone TAE 1X:

Tris acetato	0.04 M
EDTA	1 mM

TE buffer:

Tris HCl	10 mM pH 8.0
EDTA	0.1 mM pH 8.0

6.2 Costruzione dei plasmidi

Per questo studio è stato utilizzato il plasmide di espressione per le cellule eucariotiche pVax1TM (Invitrogen), il plasmide di espressione per sistemi procariotici pRSET B (Invitrogen) e il vettore di clonaggio pUC19, Fig.11.



Fig. 11: Vettori utilizzati per il clonaggio dei geni Cpb1 e PO.

La sequenza codificante i due antigeni di *Leishmania* Cpb1 e PO soon stati inseriti nel vettore pVax1TM per ottenere il plasmide pVAX/Cpb1/Po. pVAX/Cpb1/Po codifica la sequenza completa di due geni Cpb1 e PO clonati a valle del promotore del citomegalovirus (CMV) e a monte della sequenza di poliadenilazione del growth hormone bovino (BGH). La sequenza dei geni Cpb1 e PO è stata ottenuta da GeneBank (accession number AJ628942.1 e X72714.1 rispettivamente) e sono stati sintetizzati da GeneScrip, USA Inc. in una formazione a concatamero legata da sequenza ripetuta codificante per un ponte flessibile costituito da serine e glicine con

un residuo di treonina che funge da cardine, permettendo ai due bracci del ponte di ruotare (Robinson and Sauer, 1998).

Il plasmide pVAX/Cpb1/Po è stato utilizzato per la transfezione in vitro e il trial clinico vaccinate.

Il plasmide pUC CPB1/PO codifica i geni Cpb1/PO in fusione clonati a livelli del multiple cloning site (MCS) del vettore di clonaggio pUC19 ed è stato utilizzato come controllo negativo nella transfezione in vitro.

Il plasmide pRSET B/ CPB1-PO è stato costruito tramite sintesi dei geni in fusione Cpb1-PO a monte del promotore T7 e a valle del terminatore T7 da GeneScripIt, USA Inc. Il plasmide è stato utilizzato per l'espressione della proteina ricombinante rCPB1-PO nel sistema procariotico E. coli BL21.

5.3- Sequenziamento dei plasmidi ottenuti

I costrutti sono stati sequenziati dal servizio di sequenziamento BMR Genomics (Padova, Italy) per verificare la correttezza del clonaggio.

6.3 Trasformazione dei ceppi batterici

Per permettere l'amplificazione dei vettori ceppo di E.coli DH5alpha è stato trasformato con i plasmidi pVAX/Cpb1/Po e pUC CPB1/PO mediante shock termico:

- *aggiungere 4 µl del plasmide ricombinante in una provetta contenente E. coli competenti*
- *incubare in ghiaccio per 30 minuti*
- *incubare a 42°C per 30 secondi*
- *trasferire immediatamente la provetta con le cellule in ghiaccio*
- *aggiungere 900 µl di LB a temperatura ambiente*
- *incubare su agitatore a 37°C per 1 ora*
- *piastrare su LB agar addizionato con kanamicina (50 µg/ml) o ampicillina (50 µg/ml) ed incubare o/n*

Mentre il plasmide pRSET B/ CPB1-PO è stato utilizzato per trasformare il ceppo di E. coli BL21, sistema di espressione adatto per il plasmide utilizzando il kit TransformAid Bacterial Transformation (Fermentas) seguendo il protocollo indicato dal costruttore:

- *Aggiungere 50 µl di BL21 da una coltura o/n a 250 µl di C-medium*
- *Incubare a 37° per 20 minuti e centrifugare 1 min a 400 RPM*
- *Risospendere in T-solution e incubare 5 min in ghiaccio*
- *Aggiungere il DNA plasmidico e incubare in ghiaccio 5°*
- *Piastrare su terreno selettivo*

6.4 Purificazione del DNA plasmidico

Le colonie di DH5alfa trasformate e cresciute su terreno selettivo sono state messe in coltura in 300 ml di terreno LB addizionato con kanamicina (50 µg/ml) e incubate a 37°C o/n; le colture batteriche sono state utilizzate per ottenere preparazioni maxiprep con il kit Plasmid DNA Isolation Maxiprep kit (Qiagen) secondo il seguente protocollo:

- *pellettare la coltura batterica*
- *risospendere il pellet in 10 ml di Buffer P1*
- *aggiungere 10 ml di Buffer P2, miscelare invertendo vigorosamente 4-6 volte e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti*
- *aggiungere 10 ml di Buffer P3, miscelare vigorosamente invertendo 4-6 volte e incubare in ghiaccio per 20 minuti*
- *centrifugare a 20000 x g per 30 minuti a 4°C*
- *equilibrare le colonne con 10 ml di Buffer QBT e lasciar eluire per gravità*
- *aggiungere il surnatante dello step 5 alla colonna equilibrata e lasciare eluire per gravità*
- *lavare la colonna con 60 ml di Buffer QC e lasciare eluire per gravità*
- *eluire il DNA con 15 ml di Buffer QF*
- *precipitare il DNA aggiungendo 10.5 ml di isopropanolo a temperatura ambiente e centrifugare a >15000 x g per 30 minuti a 4°C*
- *eliminare delicatamente il surnatante e lavare il pellet di DNA con 1 ml di etanolo 70% a temperatura ambiente*

Per poter inoculare in vivi il DNA plasmidico i batteri trasformati con pVAX/Cpb1/Po sono stati messi in coltura in volumi di 2,5 l di LB medium per essere purificati con il kit EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen) utilizzando materiale apirogeno e eludendo il DNA in acqua distillata sterile e apirogena. Il protocollo è comparabile a quello già indicato per Plasmid DNA Isolation Maxiprep kit (Qiagen).

6.5 Espressione *in vitro* del gene di fusione cpb1-po

Sono state allestite colture di cellule HEK (Human Embryonic Kidney) 293 in terreno di coltura supplementato con 10% FBS, a 37°C in incubatore con 5% CO₂. Le colture cellulari sono state transfettate con il vettore pVAX/Cpb1/Po mentre il plasmide pUC/CPB1/PO è stato utilizzato per il controllo negativo. Per la transfezione è stato usato il kit CalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech) secondo il seguente protocollo:

- *piastrare le cellule il giorno prima della transfezione*
- *30 minuti-3 ore prima della transfezione sostituire il terreno di coltura con medium fresco*
- *per ogni esperimento di transfezione preparare la soluzione A e la soluzione B indicato:*

SOLUZIONE A:

2-4 µg di plasmide
H₂O sterile a volume
12.2 µl soluzione di calcio 2M
100 µl volume totale

SOLUZIONE B:

100 µl 2X HBS

- *vortexare con attenzione la soluzione B e contemporaneamente aggiungere la soluzione goccia a goccia*
- *incubare la soluzione di transfezione a temperatura ambiente per 20 minuti*

- *vortexare con attenzione la transfezione cellulare e aggiungere goccia a goccia nelle piastre con le colture cellulari*
- *incubare le piastre per 2-12 ore a 37°C, 5% CO₂*
- *rimuovere la soluzione di transfezione e lavare le piastre con medium fresco o PBS 1X*
- *aggiungere terreno fresco ed incubare a 37°C*
- *effettuare i test per l'espressione dei geni esogeni o la selezione 24-72 ore dopo la transfezione*

Dopo 48 ore le cellule sono state sottoposte a tre lavaggi con PBS ed è stato estratto l'RNA totale con Trizol® reagent (Invitrogen) con il seguente protocollo:

- *aggiungere 1 ml di Trizol® reagent direttamente nelle piastre (di diametro di 3.5 cm) con le colture cellulari e miscelare bene con la pipetta per lisare le cellule*
- *incubare il campione per 5 da 15 minuti a 30°C per ottenere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici*
- *aggiungere 0.2 ml di cloroformio per ogni ml di Trizol® reagent e miscelare vigorosamente per 15 secondi; incubare da 15 a 30°C per 2-3 minuti*
- *centrifugare i campioni a 12000 x g per 15 minuti a 2-8°C*
- *recuperare la fase acquosa (surnatante) contenente l'RNA e trasferirla in una nuova provetta*
- *per precipitare l'RNA aggiungere 0.5 ml di alcool isopropilico per ogni ml di Trizol® reagent utilizzato e incubare da 15 a 30°C per 10 minuti*
- *centrifugare a 12000 x g per 10 minuti a 2-8°C*
- *rimuovere il surnatante e lavare il pellet di RNA con 1 ml di etanolo 75% per ogni ml di Trizol® reagent utilizzato inizialmente, vortexare e centrifugare a 7500 x g per 5 minuti a 2-8°C*
- *rimuovere l'etanolo, asciugare il pellet all'aria e risospendere in acqua RNAsi-free*

Il cDNA è stato sintetizzato con il sistema SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen) secondo il seguente protocollo:

- *miscelare bene i campioni di RNA e centrifugarli brevemente*
- *preparare il mix di RNA/primers in una provetta sterile come segue:*
- *incubare ogni campione a 65°C per 10 minuti e poi mettere in ghiaccio per 1 minuto*
- *preparare il seguente mix di reazione aggiungendo ogni componente nell'ordine indicato:*
- *aggiungere 9 µl di questo mix alla miscela RNA/primer, miscelare gentilmente e centrifugare brevemente*
- *incubare a 42°C per 2 minuti*
- *aggiungere 1 µl (50 U) di SuperScript™ II RT ad ogni provetta campione, eccetto il "no RT control"; miscelare ed incubare a 42°C per 50 minuti*
- *terminare la reazione a 70°C per 15 minuti ed in seguito raffreddare in ghiaccio*
- *aggiungere 1 µl di RNAsi H ad ogni campione ed incubare per 20 minuti a 37°C*
- *preparare il mix di amplificazione in una nuova provetta, utilizzando i primer MagP48/BamHI/K/ATG/F and MagP48/ECO/R*
- *miscelare gentilmente e avviare il programma di PCR*

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel di agarosio all'1%.

Il grado di espressione della proteina CPB1-PO è stato valutato in immunoblotting ripetendo l'esperimento tre volte. L'SDS-PAGE e il blotting sono stati condotti secondo le indicazioni del produttore, mentre per la rivelazione è stato seguito il seguente protocollo:

- *immergere la membrana in almeno 100 ml di Blocking Solution e incubare a 37°C 30-60 minuti*
- *effettuare due lavaggi in TTBS per 5 minuti in oscillatore*
- *aggiungere la soluzione con il primo anticorpo (1:3000 in Antibody Buffer) e mettere in agitazione per un'ora*
- *effettuare due lavaggi in TTBS per 5 minuti in oscillatore*
- *aggiungere la soluzione con la proteina-G (0.5µl/ml in Antibody Buffer) e mettere in agitazione per un'ora*
- *effettuare due lavaggi in TTBS per 5 minuti in oscillatore*
- *lavare una volta con TBS per 5 minuti ponendo in agitazione nell'oscillatore, per eliminare il Tween-20*
- *aggiungere il substrato per visualizzare il legame*
- *lavare due volte con acqua distillata per bloccare la reazione*

6.6 Trial clinico

In questo studio sono stati inclusi 17 cani, ospedalizzati presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università di Napoli. I cani tutti reclutati tra animali residenti nella regione Campania appartenevano razze diverse ed erano di età compresa tra 1 e 10 anni di età. Tutti i cani avevano acquisito infezione naturale da *Leishmania infantum* ed erano stati diagnosticati in corso di CanL sulla base delle manifestazioni cliniche, anticorpi specifici misurati in immunofluorescenza IFAT e qPCR. I criteri per l'inclusione nello studio sono stati : sintomatologia riconducibile a leishmaniosi (perdita di peso, linfoadenopatia periferica, lesioni cutanee, lesioni oculari, epistassi, zoppia, ulcere, diarrea e moderata glomerulopatia) e alterazioni dei parametri ematobiochimici compatibili con la malattia

(trombocitopenia, anemia, leucopenia, proteine totali e beta globuline sopra i range di riferimento); presenza di anticorpi anti- *Leishmania* al di sopra del valore $\geq 1:80$; e carica di *Leishmania* nei prelievi da linfonodi superiore a 100 parassiti/ml.

Ad ogni animale è stato attribuito un punteggio per le anomalie riscontrate nei parametri di laboratorio e per il tipo e la gravità dei sintomi riscontrati. La scala di questo punteggio va' da 0 a 9 e i valori vengono sommati per ottenere uno score clinico (Manna et al. 2008) che descriva la fotografia clinica dell'animale esaminato.

6.7 Protocollo vaccinale

Il gruppo degli animali vaccinati comprende 12 cani trattati con tre dosi da 1 mg di plasmide pVax/cpb1-po somministrato contemporaneamente IM (0,5 mg) e SC (0,5 mg). I 5 cani del gruppo di controllo hanno ricevuto la stessa dose di pVax1 senza le sequenze codificanti per gli antigeni di *Leishmania*. Tutti i cani sono stati inoculati 3 volte ai giorni 0, 15 e 30 dell'esperimento. L'efficacia della terapia è stata valutata nei giorni 0, 15, 30 e 3, 6 e 12 mesi dall'inizio della terapia. A tutti i cani è stato assegnato un punteggio di clinical score sulla base della presenza e gravità della sintomatologia clinica e delle alterazioni dei parametri di laboratorio. Inoltre

è stato misurato il titolo degli anticorpi specifici tramite IFAT e la carica di DNA di *Leishmania* da aspirati linfonodi tramite qPCR. I livelli di espressione degli mRNA delle citochine IFN-gamma e IL-4 sono stati misurati sempre con qPCR ad ogni timepoint.

6.8 Prelievi

I campioni di sangue intero sono stati raccolti dai cani in provette con EDTA da venipuntura cefalica. Gli aspirati da linfonodo sono stati ottenuti tramite biopsia con ago sottile da linfonodo popliteo. Tutti i campioni sono stati conservati a -80°C.

6.9 Colture parassitarie

I ceppi di riferimento IPT1 ZMON1 è stato gentilmente fornito dal Centro di Referenza Nazionale per la Leishmaniosi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (Palermo, Italy). Il ceppo IPT1 sono stati coltivati in Tobie agra medium (Tobie et al., 1950) modificato da Evans con 15% di rabbit blood, 5% di fetal bovine serum, 250 µg of gentamicina/ml, e 500 µg/ml 5-fluorocitosina. Le colture sono state incubate a 25°C per 7 giorni.

6.10 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dalle colture parassitarie è stata svolta come descritto da Sloan et al. (1996) con alcune modificazioni:

- *centrifugare la coltura 15 min a 3500xg a 4°C*
- *risospendere il pellet in lysis buffer (50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) con 1% sodio dodecil solfato e incubare a 30°C per 60 min*
- *aggiungere 0.1mg/ml di proteinasi K e incubare h a 60°C*
- *estrarre due volte con fenolo- cloroformio-isoamil alcool (25:24:1, v,v,v)*
- *precipitare il DNA con sodio acetato 0.3 M, 2.5 volumi di etanolo ghiacciato e centrifugando 13000xg per 20 min*
- *lavare con etanolo 70% e risospendere in acqua distillata*

Il DNA proveniente dalle biopsie linfonodi è stato estratto utilizzando QIAamp Blood (Qiagen) e seguendo le indicazioni del costruttore. La concentrazione e la purezza del DNA sono state misurate allo spettrofotometro l'assorbanza tra 260 e 280 nm.

6.11 Isolamento del RNA e sintesi del cDNA

Dai campioni sangue intero dei cani è stato estratto RNA totale utilizzando il kitSV total l'RNA isolation system kit (Promega) seguendo le istruzioni del costruttore. L'RNA estratto è stato risospeso in 100 µl di acqua distillata

trattata con dietim pirocarbonato (DEPC) e congelato a -80°C. Per la sintesi del cDNA per la misura dei livelli di mRNA di citochine è stato utilizzato il sistema Im Prom-Itm Reverse Transcription System.

6.12 Disegno dei primers e delle sonde

I primers e le sonde fluorogeniche per il DNA di *Leishmania* sono state disegnate nelle regione costante dei minicircoli del DNA kinetoplastidico (GeneBank Accession Number AF291093). Le sonde fluorogeniche sono state sintetizzate utilizzando una molecola reporter FAM legata all'estremità 5' e un quencer TAMRA legata all'estremità 3' (Applied Biosystems). I primers TaqMan e le sonde sono stati disegnati con il programma Primer Express Software (Applied Biosystems) in accordo con i parametri tecnici. La tabella X indica i primers e le sonde per il DNA di *Leishmania infantum*, per il gene housekeeping dell'actina e per gli mRNA del' IL-4 e del IFN-gamma.

6.13 Analisi in real time PCR

Le reazioni di real time PCR sono state calcolate per un volume di 25 µl calcolando 12.5 µl di Taq Man Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM di ciascun primer, 250 nM di sonda fluorogenica, and 50 ng of DNA or

cDNA. Il programma di cycling consiste in una fase di incubazione iniziale di 2 min a 50 °C, seguita da una fase di denaturazione di 10 min a 95 °C, e 50 cicli a 95 °C per 15 s e 60 °C for 1 min ciascuna e si è svolto nel sistema Abi Prism 7000 (Applied Biosystem) in una piastra singola da 96 pozzetti. In ogni piastra è stato incluso un controllo negativo e ogni standard e ogni campione è stato analizzato in triplicato per ogni corsa. Il valore del cycle threshold (CT) è stato calcolato per ogni campione determinando il punto al quale la fluorescenza supera quella del threshold. Per normalizzare le differenze nell'efficienza di estrazione degli acidi nucleici o nella sintesi del cDNA sono stati scelti due geni housekeeping : la beta-actina e la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GADPH).

Sette concentrazioni differenti di DNA di *Leishmania* sono state utilizzate per determinare una curva standard assoluta. Per creare la curva assoluta è stata costituita una soluzione standard di DNA di *Leishmania* estraendo da 10⁹ promastigoti. La concentrazione del DNA è stata misurata tramite spettrofotometro. Dalla diluizione standard sono state ottenute diluizioni seriali per ottenere i punti di una curva in un'arco da 10⁶ a 1 cellula. La differenza da ogni punto della curva corrisponde ad un Log.

Per calibrare la misura della carica parassitaria di *Leishmania* nei tessuti è stato scelto il DNA del linfonodo, che ha i più alti livelli di espressione di GADPH.

Per preparare le curve standard della quantificazione relativa dei livelli di espressione delle citochine è stato utilizzato uno stock di RNA totale in soluzione accuratamente diluito. Per la determinazione dei livelli di espressione delle citochine, è stato scelto come calibratore il livello di espressione delle stesse nei cani sani. Curve standard sono state preparate sia per i geni target che housekeeping. Quindi il valore del DNA target è stato diviso per il valore del gene housekeeping per normalizzare il risultato. Questo risultato è ancora normalizzato con il valore del calibratore per ottenere i livelli relativi di espressione delle citochine.

6.14 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata svolta col software GraphPad InStat software 3.0. La significatività delle differenze riscontrate nei due gruppi è stata valutata attraverso i test Anova. Tutte le conclusioni sono basati su valori di significatività di $P < 0.05$. I diagrammi dei risultati sono stati ottenuti con lo stesso software.

6.15 Espressione e purificazione dell'antigene di fusione CPB1-PO

Il ceppo di *E. coli* BL21 è stato trasformato con il plasmide pRSETB/cpb1-po come descritto in precedenza. Le colonie trasformate sono state selezionate per la resistenza all'antibiotico codificata dai plasmidi; queste colonie sono state messe in coltura su piccola scala. Da queste colture sono stati estratti i plasmidi con il Plasmid DNA isolation Miniprep kit (Qiagen), come descritto in precedenza. I plasmidi estratti sono stati digeriti con gli enzimi BamHI ed EcoRI per verificare la presenza dell'inserto ed i prodotti di digestione sono stati visualizzati in elettroforesi su gel d'agarosio al 2%. Le colonie trasformate stabilmente con il plasmide pRSETB/cpb1-po sono state messe in coltura su scala maggiore in terreno LB con ampicillina (50 µg/ml). Quando le colture hanno raggiunto la fase logaritmica precoce, è stata indotta l'espressione della rCPB1-PO mediante l'aggiunta di IPTG alla concentrazione finale di 0.5 mM. Dopo quattro ore dall'induzione, i batteri sono stati centrifugati e lisati con i convenzionali metodi fisico-chimici e la proteina di fusione è stata recuperata dalla frazione insolubile e purificata con cromatografia d'affinità. La resa e la purezza della rCPB1-PO sono state valutate in SDS-PAGE.

6.16- SDS-PAGE e Western blot (WB)

La reattività immunologica della proteina rCPB1-PO purificata è stata valutata attraverso la reazione in WB con sieri di cani precedentemente titolati con metodica IFAT. Sia la rCPB1-PO che il BenchMark™ Pre-stained Ladder (Invitrogen, Italia) sono stati fatti correre su NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Zoom Gels (Invitrogen) nella XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen) secondo le indicazioni operative del produttore. Il trasferimento elettroforetico nella membrana di nitrocellulosa (Hybond-ECL; Amersham Pharmacia Biotech) è stato eseguito con un sistema mini-Trans-Blot electrophoretic cell system (Bio-Rad). La membrana è stata fissata incubandola per un'ora a temperatura ambiente con una soluzione di skim milk al 5% in TBS. I sieri dei cani messi a reagire avevano titolazioni in IFAT comprese tra 1:20 a 1:1260 e sono stati diluiti 1:100 in TTBS (TBS con 0,05% tween 20 e 1% skim milk) e sono stati aggiunti alla membrana e il tutto è stato messo ad incubare per un'ora a temperatura ambiente. Trascorso il tempo di incubazione, la membrana è stata lavata tre volte con TTBS e messa ad incubare per un'ora a temperatura ambiente con la soluzione contenente l'anticorpo secondario (diluito 1:500 in TTBS) costituito da un anticorpo anti-dog di capra coniugato con perossidasi

(Sigma). La membrana è stata nuovamente sottoposta a tre lavaggi con TTBS e trattata per la rivelazione con il CN/DAB substrate kit (Pierce).

6.17 ELISA assay

Gli stessi sieri utilizzati per il WB sono stati utilizzati per allestire un ELISA assay. Le piastre microplate (Nunc maxysorp) sono state sensibilizzate mettendo ad incubare i pozzetti tutta la notte a 37°C con 10 ng/well di rCPB1-PO. Dopo quattro lavaggi con PBS le piastre sono state bloccate con 150 μ l/well di PBS contenente 2.5% di caseina (Sigma) e messe nuovamente in incubazione per un'ora a 37°C; trascorso il tempo di incubazione sono state sottoposte a 4 lavaggi e sono stati aggiunti i campioni di siero (100 μ l/well) diluiti 1:300 e 1:600 con una soluzione di PBS contenente 1.25% di caseina. Le piastre così preparate sono state messe ad incubare per due ore a 37°C. In seguito sono state nuovamente lavate e incubate con anticorpi di capra anti-dog (Sigma), marcati con perossidasi (100 μ l/ml). Dopo i lavaggi finali, la reazione enzimatica è stata sviluppata con p-nitrofenilfosfato in soluzione di 3,3',5,5'-tetrametil-benzoidina (Zymed Labs) e bloccata dopo 5 minuti mediante l'aggiunta di acido solforico 0.2 M ed è stata letta a 450 nm.

Capitolo 7

Risultati

7.1 Costruzione dei plasmidi contenenti il gene di fusione cpb1-po

Il plasmide pVax/cpb1-po è stato disegnato per valutare il potenziale immunoterapeutico delle vaccine a DNA per il trattamento della CanL. Per aumentare la risposta immune generata dal vaccino i geni cpb1 e po sono stati fusi tramite una sequenza codificante un ponte di glicine e serine. Il sequenziamento del DNA ha confermato la corretta sintesi di cpb1-po in Pvx1. Anche la sequenza di pUC/cpb1-po, plasmide utilizzato come controllo negativo nella transfezione in vitro, e il plasmide pRSETB/cpb1-po, utilizzato per l'espressione della proteina ricombinante nel sistema BL21, sono state confermate tramite sequenziamento.

7.2 Espressione *in vitro* dell'antigene CPB1-PO

Per verificare l'effettiva trascrizione e traduzione del gene cpb1-po nelle cellule di mammifero il RNA totale e le proteine sono state isolate da cellule HEK 203T transfettate con pVax/cpb1-po. Il mRNA di cpb1-po è

stato amplificato in RT-PCR a partire dal RNA totale del lisato cellulare. Un amplicone di 1330 bp e 900 pb corrispondenti rispettivamente ai geni *cpb1* sono mostrati nella corsa elettroforetica delle reazioni di RT-PCR, Fig.12 (A). L'immunoblotting dello stesso lisato cellulare ha confermato la corretta trascrizione del prodotto genico di fusione CPB1-PO, Fig.12 (B).

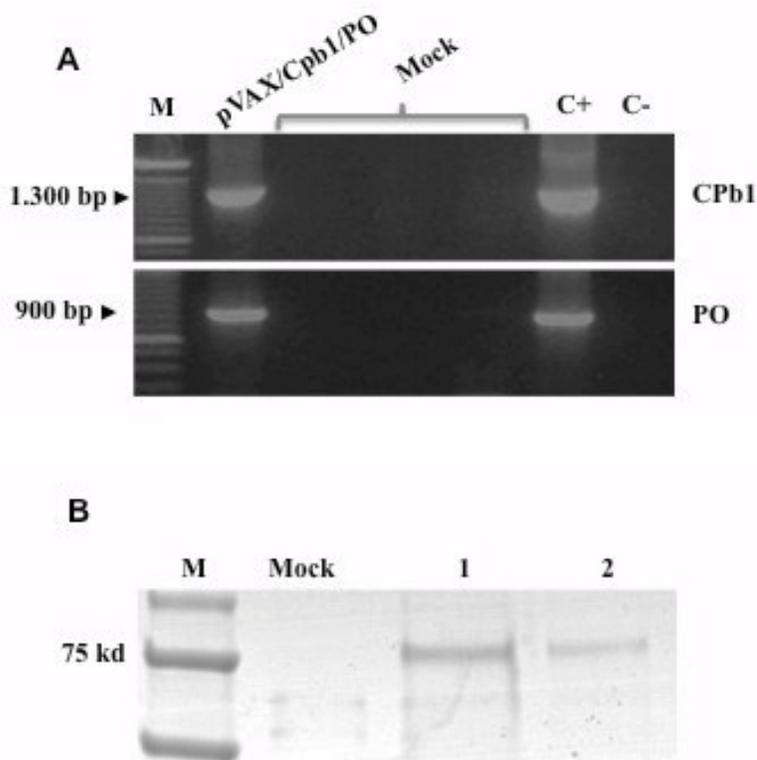


Fig.12: *Trascrizione e traduzione di CPB1-PO di identificata tramite RT-PCR e Immunoblotting da cellule HEK 293 transfettate. Le cellule sono state transfettate con il plasmide di espressione pVax/cpb1-po e col plasmide di clonaggio pUC/cpb1-po per il controllo negativo (mock). La sintesi del mRNA specifico è stato identificato tramite RT-PCR 48 ore dopo la transfezione (A). Nello stesso momento la proteina CPB1-PO è stata identificata in immunoblotting (B) usando antisieri di cani *Leishmania* positivi solo nelle cellule transfettate con pVax/cpb1-po.*

7.3 Valutazione del clinical score

Prima dell'inizio della terapia (T0) il gruppo dei cani vaccinati ha un valore medio di clinical score di 7, mentre il gruppo di controllo è attestato a 5. Tre mesi dopo l'inizio della terapia il gruppo dei cani vaccinati mostra un progressivo miglioramento della sintomatologia dimostranti da una diminuzione del valore medio del clinical score (Fig.13). Questo trend di diminuzione continua fino ai sei mesi dall'inizio della terapia. Dopo questo momento il valore medio del clinical score dei cani vaccinati cominci lentamente a risalire, e tre dei dodici cani a questi punto hanno avuto una ricaduta. Il valore medio del clinical score del gruppo di controllo aumenta progressivamente dall'inizio fino al termine dell'esperimento.

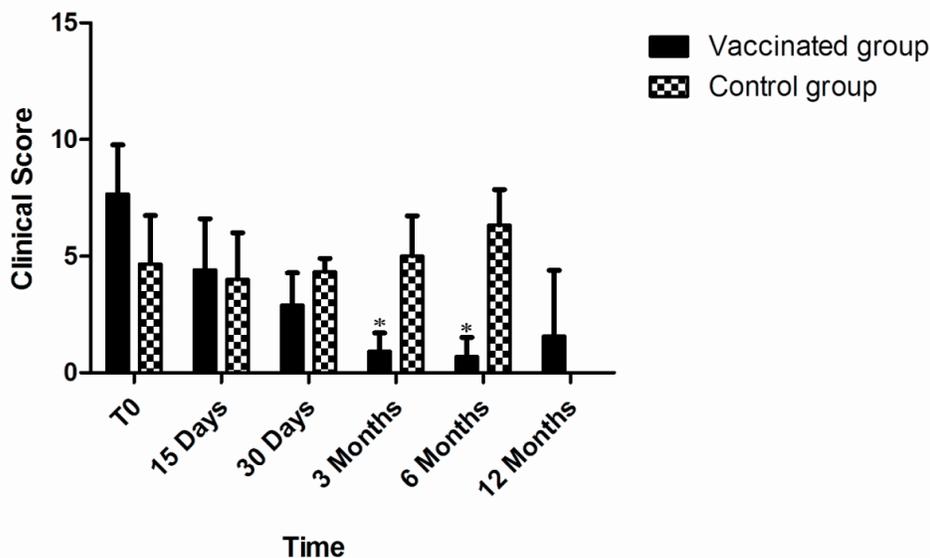


Fig.13-Valutazione del clinical score durante il trial clinico. Le colonne nere rappresentano il gruppo dei cani vaccinati (12 cani) mentre le colonne quadrettate rappresentano il gruppo di controllo (5 cani). Entrambi i gruppi sono stati inoculati ai tempi 0, 15 e 30 giorni e monitorati fino ai 12 mesi post-inoculazione. Ad ogni tempo i cani sono stati sottoposti a valutazione clinica. Le barre di errore indicano l'errore standard (\pm SD), * $p = 0.03$.

7.4 Valutazione del carico di DNA di *Leishmania*

A partire dai 30 giorni dall'inizio dell'immunoterapia i cani vaccinati mostrano una diminuzione importante di copie di *Leishmania* DNA che continua fino al tempo 3 mesi. Da questo momento il numero di copie di DNA di *Leishmania* inizia a incrementare progressivamente ma senza mai raggiungere i livelli iniziali. Il gruppo di controllo invece mostra un aumento progressivo del carico di DNA di *Leishmania* (Fig.14

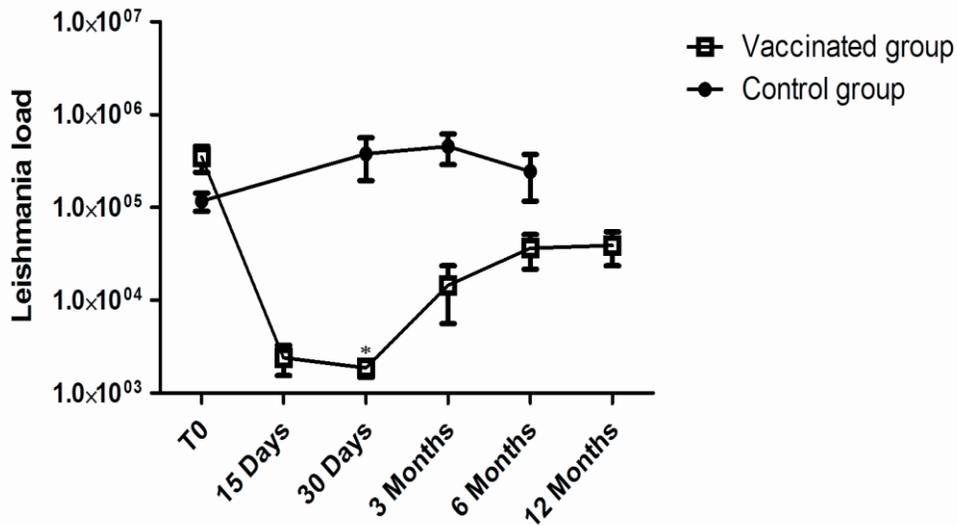


Fig.14- *Valutazione del carico parassitario Tramite q-PCR*. I quadrati rappresentano il gruppo dei cani vaccinati (12) mentre i cerchi rappresentano il gruppo di controllo (5). Il numero di copie di DNA di *Leishmania* è stato misurato in q-PCR a partire da biopsie con ago sottile prelevate da linfonodo popliteo. L'asse delle scisse indica il numero di *Leishmania*/ml espresso in scala logaritmica. Le barre di errore indicano l'errore standard (\pm SD), *p = 0.03.

7.5 Valutazione del titolo anticorpale specifico tramite IFAT

Il gruppo dei cani vaccinati mostra un trend di diminuzione del titolo di anticorpi anti-*Leishmania* nel periodo compreso tra i 15 e i 30 dall'inizio della terapia, Fig.15. I valori non hanno rilevanza statistica. Il gruppo di controllo mostra un'incremento costante degli anticorpi specifici lungo tutta la durata dell'esperimento.

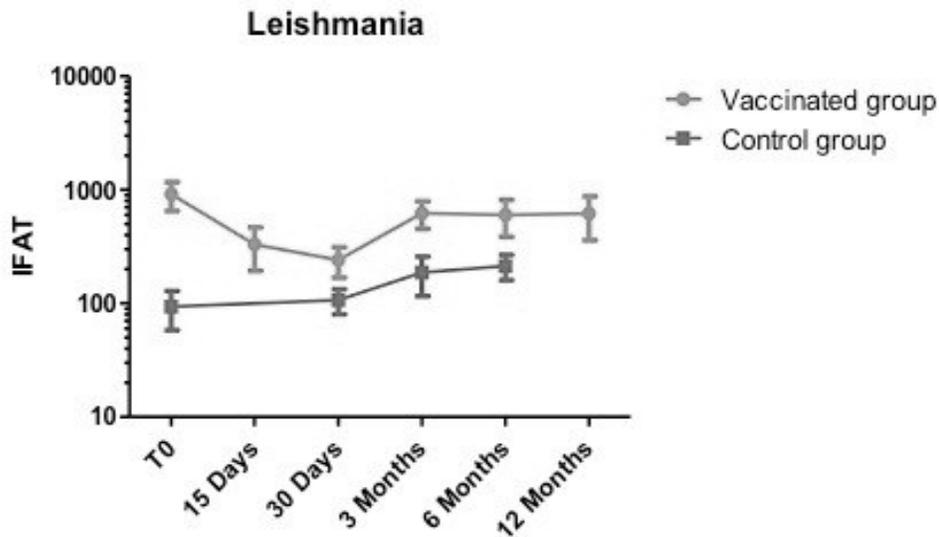


Fig.15 - *Valutazione del titolo anticorpale specifico dei sieri tramite IFAT.* I quadrati rappresentano il gruppo dei cani vaccinati (12) mentre i cerchi rappresentano il gruppo di controllo (5). L'ascisse indica l'inverso della diluizione del siero espresso in scala logaritmica. Le barre di errore indicano l'errore standard (SD). Il gruppo dei cani vaccinati mostra una leggera inflessione nei titoli anticorpi specifici nei momenti T15 e T30.

7.6 Ricerca degli mRNA delle citochine nei PMCB

I livelli di espressione del mRNA del IFN- γ e del IL-4 sono stati monitorati tramite qPCR, Fig.16 (A). I livelli del IFN- γ dei cani vaccinati mostrano un'aumento statisticamente significativo nei giorni 15 e 30 dall'inizio della terapia mentre non sono state individuate differenze nei livelli di espressione del mRNA di IL-4, Fig.16 (B)

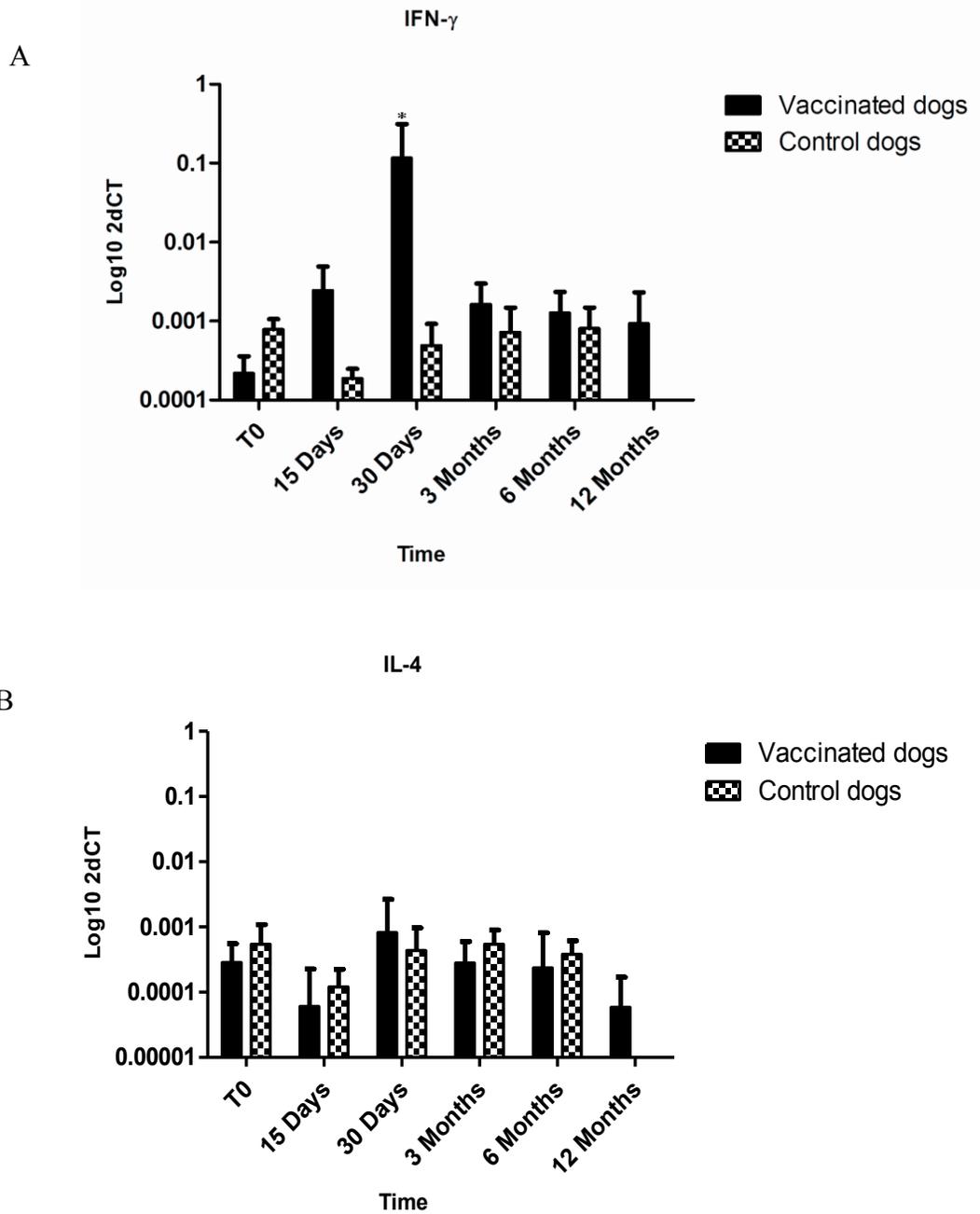


Fig.16 -Analisi trascrizionale dei livelli del mRNA di citochine da PMCB durante l'immunoterapia. Le colonne nere rappresentano il gruppo dei cani vaccinati (12 cani) mentre le colonne quadrettate rappresentano il gruppo di controllo (5 cani). In ascisse sono indicati i valori del 2DeltaCT convertiti in scala logaritmica. Le barre di errore indicano l'errore standard (\pm SD), *p = 0.01

7.7 Espessione, purificazione e immunoreattività dell'antigene rCPB1-PO

L'espressione dell'antigene CPB1-PO è stata verificata tramite SDS PAGE che conferma la quarta ora dall'induzione come momento di massima espressione della proteina (Fig.17). La proteina purificata su colonna al nichel è stata quantificata con BSA e successivamente messa a reagire in immunoblotting con sieri di cani a diverso titolo anticorpale precedentemente determinato in IFAT. L'antigene rCBB1-PO reagisce anche con sieri a titolo più basso (1:20) di anticorpi anti-*Leishmania* (Fig.18) suggerendo alta sensibilità dell'antigene in ELISA assay.

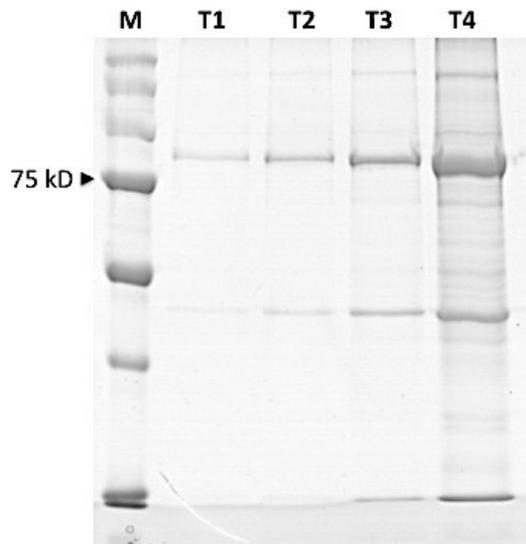


Fig.17: SDS PAGE del lisato di BL21 trasformato con *pRSETB/cpb1-po* dopo induzione con IPTG.

La banda di circa 80 kD che aumenta di intensità da T1 a T4 rappresenta la proteina rCPB1-PO prodotta da *E. coli* BL21.

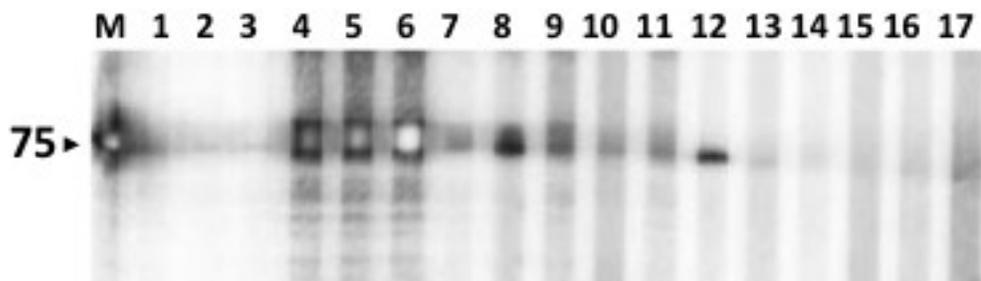
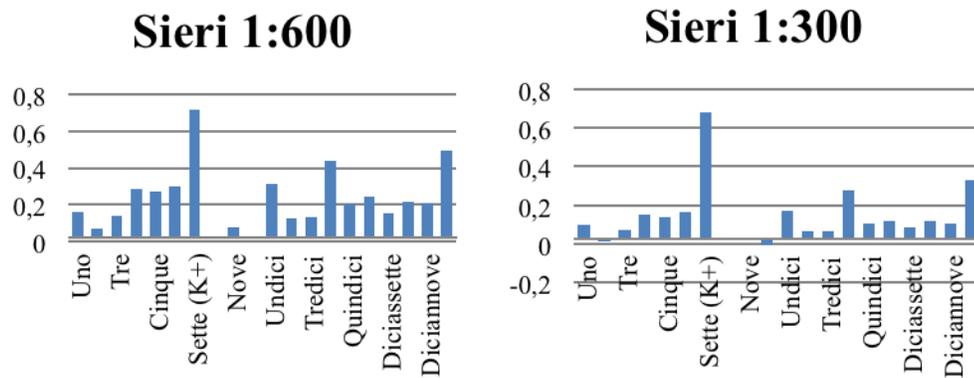


Fig.18: *Immunoblotting allestito con rCPB1-PO e sieri di cani titolati in IFAT per anticorpi anti-Leishmania. L'antigene viene riconosciuto anche dai sieri a diluizioni più basse*

Valutazione dell'antigene rCPB1-PO in ELISA assay

L'antigene rCPB1-PO adsorbito su 96 well di piastre ELISA è stato utilizzato per allestire un ELISA assay con gli stessi sieri utilizzati in Immunoblot diluiti 1:300 e 1:600. Un aumento dell'assorbanza è stato rilevato in spettrofotometria anche per i sieri a titolo più basso con concentrazioni dell'antigene di solo 10 ng per pozzetto e diluizioni di siero 1:600



(Fig.19)

Fig.19 - Box-plot di assorbanza dell ELISA assay con l'antigene rCPB1-PO.

Capitolo 8

Discussione e conclusioni

La vaccinazione con DNA si è dimostrata capace di indurre una risposta sia umorale che cellulare. Le cellule Th1 sono in grado di attivare i macrofagi a distruggere i microorganismi intracellulari e attiva le cellule B a produrre anticorpi opsonizzanti come IgG2a e IgG2b (Gurunathan et al., 2000). In questo studio è stato disegnato un plasmide sullo scheletro di pVAX1 in grado di esprimere gli antigeni CPB1 e PO di *Leishmania infantum* ed è stato valutato su cani affetti da forme sintomatiche di CanL. Come mostrato in Fig.1 il mRNA di CPB1-PO è stato osservato nelle cellule HEK 293T assieme alla presenza della proteina di fusione individuata in Immunoblotting. CPB1 e PO possono rappresentare candidati ideali per lo sviluppo di un vaccino contro l'infezione di *Leishmania*. Le cistein proteasi (CPs) sono enzimi che appartengono alla superfamiglia delle papaine, che si ritrovano in un grande numero di organismi, dai procarioti ai mammiferi. Dati in letteratura che le cistein proteasi (CPB e CPA) inoculate sotto forma di proteine ricombinanti o vaccino a DNA sono in grado di stimolare un risposta immune protettiva contro *L. major* nel modello murino (Rafati S et al., 2001; Zadeh-Vakili A et al., 2004; Rafati S et al., 2006). L'analisi della

risposta immune ha dimostrato che gli animali vaccinati hanno sviluppato una risposta di tipo Th1 che è associata and un incremento della produzione del IFN- γ . PO è una proteina ribosomale acida la cui somministrazione in forma solubile ricombinante o sotto forma di DNA conferisce immunità protettiva contro il challenge con *L. major* in topi BALB/c (Iborra S. et al. 2003).

L'immunità protettiva contro i parassiti di *Leishmania* si si crede sia dovuta all'intervento delle sottopopolazioni di linfociti T helper di tipo 1 (Strauss-Ayali et al., 2007). L'attivazione dei linfociti Th1 determina la proliferazione linfocitaria con differenziazione e produzione di citochine quali IL-12, IFN- γ e TNF- α (Sperling and Bluestone, 1996). In presenza di TNF- α i macrofagi si attivano producendo composto reattivi dell'azoto, che sono il principale meccanismi di eliminazione di *Leishmania* (Pinelli et al., 2000). I risultati di questo studio dimostrano che la vaccinazione con pVAX/cpb1-po determinano un miglioramento delle condizioni cliniche nei cani a partire del giorno 15 dopo la prima inoculazione, assieme con una diminuzione della carda di DNA parassitario nel linfonodo. Il miglioramento del clinical score e la diminuzione del numero dei parassiti continua fino al tempo 30 giorni e si stabilizza intorno al tempo 3 mesi. Il miglioramento della sintomatologia è probabilmente legato alla diminuzione del parassitismo

tissulare. L'importante diminuzione registrata a livello della carica parassitaria è una conseguenza dell'attivazione di una risposta immunitaria effettiva. Lo sviluppo della malattia a partire dall'infezione di *Leishmania* dipende dal bilanciamento tra l'abilità dell'ospite di innescare il meccanismo immune contro *Leishmania* e le strategie del parassita rivolte all'interferenza nella presentazione dell'antigene e alla conseguente attivazione della risposta mediata dalle cellule T (Panaro et al., 2008). L'espansione delle cellule T CD4+ è stato correlato ad una diminuzione del parassitismo a livello degli organi e dei tessuti in cani sottoposti a immunoterapia e nei cani vaccinati (Guarga et al., 2000; Borja-Cabrera et al., 2004; Araújo et al., 2009). Studi precedenti basati sull'analisi dei linfociti del sangue periferico hanno correlato la risposta immunitaria protettiva con contro *Leishmania infantum* con le cellule Th1 che esprimono IL-12, IFN- γ e TNF- α , mentre il profilo citochinico Th2, rappresentato principalmente dalla secrezione del IL-4 è stato messo in relazione allo stato sintomatico della malattia (Carrillo e Moreno, 2009). Nel nostro studio al tempo 15 giorni e 30 giorni è stato segnalato un aumento significativo dei livelli di mRNA di IFN- γ in sincronia con i minimi livelli di carica parassitaria e i minimi valori di clinica score riscontrati negli animali vaccinati. I livelli del mRNA di IL-4, scelti come marcatore della risposta Th2 non mostra variazioni significative nei due

gruppi in nessun momento del clinica trial. I risultati suggeriscono che pVAX/cpb1-po sia in grado di indurre un'efficace risposta Th1. Questo effetto è transitorio e intorno ai tre mesi dopo al prima inoculazione si assiste a un progressivo declino della condizione clinica. In conclusione i risultati mostrano che il vaccino sviluppato in questo studio può essere uno strumento utile per il trattamento dei cani affetti da CanL. Sicuramente sono necessari altri studi in vivo per stabilire le reale efficacia dell'immunoterapia da sola o in associazione con la terapia convenzionale.

La metodica ELISA elimina il problema della soggettività d'interpretazione del risultato che nell' IFAT è affidata alla discrezione di un operatore. Inoltre è specifica e ha una sensibilità medio-alta in relazione agli antigeni scelti per l'allestimento. Studi precedenti dimostrano che la sensibilità può essere aumentata molto con l'uso di antigeni multipli (Gradoni, 2002; Reithinger et al., 2002; Mettler et al., 2005). In questo lavoro è stato allestito un ELISA assay pilota per saggiare sensibilità degli antigeni CBP1-PO in fusione nel reagire con antisieri di cani. I risultati del assay pilota suggeriscono che gli antigeni CPB1-PO espressi in fusione sono molto sensibili in metodica ELISA. Come si vede in Fig.8 10 ng di proteina/well sono in grado di reagire con basse concentrazioni di anticorpi anti-*Leishmania*,

corrispondenti a titolazioni 1:20 in IFAT. Questi valori di titolazioni sono considerate negative in aree endemiche. I risultati di questo primo esperimento devono sicuramente essere confermati su una scala più ampia di esperimenti e su range ancora più ampio di sieri.

Bibliografia

A.B. Reis *et al.* 2009. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128:87–95.

Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva F, *et al.* 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 77:557–561.

Abu-Dayyeh I, Shio MT, Sato S, Akira S, Cousineau B, Olivier M. 2008. *Leishmania*-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2(12) Article ID e305.

Adhya S. 2008. *Leishmania* mitochondrial tRNA importers. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2681-5.

Aguilar-Be I, Zardo R. S., Paraguai de Souza E., Borja-Cabrera G. P., Rosado-Vallado M., Mut-Martin M., Garcia-Miss M. R., Palatnik-de-Sousa C. B., and Dumonteil E. 2005. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73, 812–819.

Akari H., Terao K., Murayama Y., Nam K.H., Yoshikawa Y. 1997. Peripheral blood CD4+CD8+ lymphocytes in cynomolgus monkeys are of resting memory T lineage. *Int. Immunol.* 9, 591–597.

Alexandre-Pires G. *et al.* 2010. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 137, 275–283

Alexandre-Pires G., de Brito M.T., Algueró C., Martins C., Rodrigues O.R., da Fonseca I.P., Santos-Gomes G. 2010. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 15;137(3-4):275-83.

Alfonzo JD, Blanc V, Estévez AM, Rubio MA, Simpson L. 1999. C to

U editing of the anticodon of imported mitochondrial tRNA(Trp) allows decoding of the UGA stop codon in *Leishmania tarentolae*. EMBO J 18: 7056-62.

Almeida M.A.O., Jesus E.E.V., Sousa-Atta M.L.B., Alves L.C., Berne M.E.A., and Atta A. M. 2005. Antileishmanial anti- body profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet. Immunol. Immunopathol. 106, 151–158.

Altmann K, Westermann B. 2005. Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell 16:5410–17.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, et al. 2004. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol 57:1–88.

Alves C., de Amorim I., Moura E. et al. 2009. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Veterinary Immunology and Immunopathology, vol. 128, no. 4, 349–358.

Amaral VF, Teva A, Oliveira-Neto MP, Silva AJ, Pereira MS, Cupolillo E, et al. 2002. Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed *Leishmania major* vaccines in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of the human disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 97:1041–8.

Anam K., Afrin F., Banerjee D., Pramanik N., Guha S.K., Goswami R.P., Gupta P.N., Saha S.K., Ali N. 1999. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6, 231–235.

Angelosanto J.M. and Wherry E.J. 2010 Transcription factor regulation of CD8+T-cell memory and exhaustion. Immunol. Rev.236, 167–175.

Antoine JC, Prina E, Courret N, Lang T. 2004. *Leishmania* spp.: on

the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Adv. Parasitol.* 58:1–68.

Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.*, 6(10):392-401.

Antonelli L.R., Dutra W.O., Oliveira R.R., Torres K.C., Guimarães L.H., Bacellar O. Gollob K.J. 2006. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4–CD8–) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 74, 6317–6323.

Araújo M.S., de Andrade R.A., Sathler-Avelar R., Teixeira-Carvalho A., Andrade M.C., Vianna L.R., Mayrink W., Reis A.B., Malaquias L.C., Mello M.N., Martins-Filho O.A. 2009. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. *Vaccine* 27, 1008–1017.

Barber G.N. 2011. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunological Reviews*, 243, 99–108.

Bates P.A., Ashford R.W. 2006. Old World leishmaniasis. In: Cox, F.E.G., Wakelin, D., Gillespie, S.H., Despommier, D.D. (Eds.), *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*, tenth ed. Parasitology, Hodder Arnold, London, 283–312.

Beattie L, Peltan A, Maroof A, Kirby A, Brown N, et al. 2010. Dynamic imaging of experimental *Leishmania donovani*–induced hepatic granulomas detects Kupffer cell-restricted antigen presentation to antigen-specific CD8 T cells. *PLoS Pathog.* 6:e1000805

Beetz S., Wesch D., Marischen L., Welte S., Oberg H.H., Kabelitz D. 2008. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* 213, 173–182.

- Bhattacharyya S, Ghosh S, Jhonson PL, Bhattacharya SK, Majumdar S.** 2001. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infection and Immunity*. 69(3):1499–1507.
- Bhunia A.K., Sarkar D., and Das P.K.** 1996. *Leishmania donovani* attachment stimulates PKC-mediated oxidative events in bone marrow-derived macrophages. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 43(5):373-9.
- Blackburn S.D. et al.** 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 10, 29–37.
- Blanchette J, Racette N, Faure R, Siminovitch KA, Olivier M.** 1999. Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN- γ -triggered JAK2 activation. *European Journal of Immunology*. 29(11):3737–3744.
- Blum JJ.** 1990. Effects of culture age and hexoses on fatty acid oxidation by *Leishmania major*. *J. Protozool.* 37:505–10.
- Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, et al.** 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J. Exp. Med.* 191:2121–30
- Boggiatto P., Ramer-Tait A., Metz K. et al.** 2010. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 17, no. 2, 267–273.
- Boitz JM, Ullman B.** 2010. Amplification of adenine phosphoribosyltransferase suppresses the conditionally lethal growth and virulence phenotype of *Leishmania donovani* mutants lacking both hypoxanthine-guanine and xanthine phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 285:18555–64.
- Borja-Cabrera G. P., Cruz Mendes A., Paraguai de Souza E., Okada L.Y.H., Trivellato F.A.A., Kawasaki J.K.A., Costa A.C., Reis A.B., Genaro O., Palatnik M., and Palatnik de Sousa C.B.** 2004. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-

vaccine. *Vaccine* 22, 2234–2243.

Borja-Cabrera G. P., da Silva V. O., da Costa R. T., Barbosa Reis A., Mayrink W., Genaro O., and Palatnik-de-Sousa C. B. 1999. The FML-ELISA assay in diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 296–301.

Borja-Cabrera G. P., Santos F. B., Nico D., Gravino A. E., Manna L., Palatnik M., and Palatnik-de-Sousa C. B. 2012. The Leishmune[®]'s Nucleoside hydrolase DNA vaccine as an aid in immunotherapy of canine visceral leishmaniasis. *Procedia Vaccinology* 1.

Borja-Cabrera G. P., Santos F. N., Santos F. B., Trivellato F. A., Kawasaki J. K., Costa A. C., Castro T., Nogueira F. S., Moreira M. A., Luvizotto M. C., Palatnik M., and Palatnik-de-Sousa C. B. 2010. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 28, 597–603.

Borja-Cabrera G.P., Correia Pontes N. N., da Silva V.O., Paraguai de Souza E., Santos W.R., Gomes E.M., Luz K.G., Palatnik M., and Palatnik de Sousa C.B. 2002. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quil Asaponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante). *Vaccine* 20, 3277–3284.

Bourdoiseau G., Bonnefont C., Hoareau E., Boehringer C., Stolle T., Chabanne L. 1997a. Specific IG1 and IG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59, 21–30.

Bourdoiseau G., Bonnefont C., Magnol J.P., Saint-André I., Chabanne L. 1997b. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56, 345–351.

Brachelente C., Müller N., Doherr M.G., Sattler U., and Welle M. 2005. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Veterinary Pathology*, vol. 42, no. 2, 166–175.

Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, et al. 1992. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur J Epidemiol* 8:273–276.

Bruske EI, Sendfeld F, Schneider A. 2009. Thiolated tRNAs of *Trypanosoma brucei* are imported into mitochondria and dethiolated after import. *J Biol Chem* 284: 36491-9.

Byrne K.M., Kim H.W., Chew B.P., Reinhart G.A., Hayek M.G. 2000. A standardized gating technique for generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood samples. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73, 167–182.

Cabral M, O'Grady J, Alexander J. 1992. Demonstration of *Leishmania specifiG celi* mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.* 14(5):531-539.

Cameron, A. McGachy, M. Anderson et al. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF- κ B signaling pathway, *The Journal of Immunology*, vol. 173, no. 5, pp. 3297–3304.

Capul AA, Hickerson S, Barron T, et al. 2007. Comparisons of mutants lacking the Golgi UDP-galactose or GDP-mannose transporters establish that phosphoglycans are important for promastigote but not amastigote virulence in *Leishmania major*. *Infect Immun* 75: 4629-37.

Carrillo E. and Moreno J. 2009. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 128, no. 1–3, 67–70.

Carvalho S. et al. 2009. Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. *Acta Trop.* 109, 131–135.

Chamizo C, Moreno J, Alvar J. 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 103:67–75.

Chance ML, Evans DA. 1999. The leishmaniases—the agent. In: Gilles

HM, ed. *Protozoal diseases*. Arnold: London, 419–425.

Chanez AL, Hehl AB, Engstler M, Schneider A. 2006. Ablation of the single dynamin of *T. brucei* blocks mitochondrial fission and endocytosis and leads to a precise cytokinesis arrest. *J Cell Sci* 119: 2968-74.

Charrière F, Helgadóttir S, Horn EK, Söll D, Schneider A. 2006. Dual targeting of a single tRNA(Trp) requires two different tryptophanyl-tRNA synthetases in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6847-52.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, et al. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 141:539–543.

Cobb M.H. 1999. MAP kinase pathways. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 71, no. 3-4, 479–500.

Cordeiro-da-Silva A., Cardoso L., Araujo N., Castro H., Tomas A., Rodrigues M., Cabral M., Vergnes B., Sereno D., Ouaissi A. 2003. Identification of antibodies to *Leishmania* silent information regulatory 2 (SIR2) protein homologue during canine natural infections: pathological implications. *Immunol. Lett.* 86, 155–162.

Corrêa A., Dossi A., Vasconcelos R., Munari D., and Lima V. 2007. Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Parasitology*, vol. 143, no. 3-4, 267–274.

Costa RT, França JC, Mayrink W, et al. 2003. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97:678–682.

da Silva V. O., Borja-Cabrera G. P., Correia Pontes N. N., Paraguai de Souza E., Luz K. G., Palatnik M., and Palatnik de Sousa C. B. 2001. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine

kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 19, 1068–1081.

Daneshvar H, Coombs GH, Hagan P, Phillips RS. 2003. *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*: attenuation of wild-type parasites and vaccination with the attenuated lines. *J Infect Dis* 187:1662–8.

Das N. K., Biswas S., Solanki S. & Mukhopadhyaya, C. K. 2009. *Leishmania donovani* depletes labile iron pool to exploit iron uptake capacity of macrophage for its exploit iron uptake capacity of macrophage for its intracellular growth. *Cell. Microbiol.* 11, 83–94.

Day M.J. 2007. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pit falls in interpretation. *Vet. Parasitol.* 147, 2–8.

De Souza Leao S., Lang T., Prina E., Hellio R., and Antoine J.C. 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *Journal of Cell Science*, vol. 108, no. 10, 3219–3231.

De Souza W. 2008. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des* 14: 822-38.

De Trez C, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, et al. 2009. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog.* 5:e1000494

Deplazes P., Smith N.C., Arnold P., Lutz H. and Eckert J. 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17, 451–458.

Descoteaux A, Matlashewski G, Turco SJ. 1992. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Journal of Immunology.* 149(9):3008–3015.

- Desfrancois J., Derré L., Corvaisier M., Le Mével B., Catros V., Jotereau Desjardins M. and Descoteaux A.** 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*. 185(12): 2061–2068.
- Desfrancois J, Derré L, Corvaisier M, Le Mével B, Catros V, Jotereau F, Gervois N.** 2009. Increased frequency of nonconventional double positive CD4CD8 alpha beta T cells in human breast pleural effusions. *Int. J. Cancer* 125, 374–380.
- Devault A, Bañuls AL.** 2008. The promastigote surface antigen gene family of the *Leishmania* parasite: differential evolution by positive selection and recombination. *BMC Evol Biol* 8: 292.
- Dias D.V., Da Costa C.A., Toledo V.P.C.P., Bambirra E., Genar, O., Michalick M.S.M., Costa R.T., Mayrink W., Oréfice F.** 1999. Leishmaniose visceral canina: estudo parasitológico, imunológico e histopatológico em olhos de cães - Parte I. *Rev. Bras. Oftal.* 58, 331–337.
- Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, et al.** 1997. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* 16:2590–98.
- Dunan S., Frommel D., Monjour L., Ogunkolade B. W., Cruz A., and Quilici M.** 1989. The Phocian veterinary study group on visceral leishmaniasis. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 11, 397–402.
- Dye C.** 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 125–130.
- Ejrnaes M. et al.** 2006. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J. Exp. Med.* 203, 2461–2472.
- Faldyna M., Levá L., Knötigová P., Toman M.** 2001. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs—a flow cytometric study. *Vet.*

Immunol. Immunopathol. 82, 23–27.

Farrell JP, Kirkpatrick CE. 1987. Experimental cutaneous Leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *Journal of Immunology*. 138(3):902–907.

Feng G.J., Goodridge H.S., Harnett M.M. et al. 1999. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania* phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *Journal of Immunology*. 163(12):6403–12.

Fernandes A. P., Costa M. M., Coelho E. A., Michalick M. S., de Freitas E., Melo M. N., Tafuri W. L., Resende Dde M., Hermont V., Abrantes Cde F., and Gazzinelli R. T. 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26, 5888–5895.

Fernandez-Perez F.J., Gomez-Munoz M. T., Mendez S., and Alunda J.M. 2003. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in a symptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop.* 86, 83–91.

Ferrer L. 1992. Leishmaniasis. In: Kirk RW, Bonagura JD, eds. *Kirk's current veterinary therapy XI*. Philadelphia: WB Saunders, 266–70.

Field MC, Carrington M. 2004. Intracellular membrane transport system in *Trypanosoma brucei*. *Traffic* 5: 905-913.

Figuroa-Angulo E, Martínez-Calvillo S, López-Villaseñor I, Hernández R. 2003. Evidence supporting a major promoter in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene. *FEMS Microbiol Lett* 225:221-25.

Fisa R, Gállego M, Castillejo S, et al. 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83:87–97.

Fondevila D., Vilafranca M., and Ferrer L. 1997. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 56, no. 3-4, 319–327.

Forget G., Gregory D. J., and M. Olivier M. 2005. Proteasome-mediated degradation of STAT1 α following infection of macrophages with *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 34, 30542–30549.

Forget G., Siminovitch K.A., Brochu S., Rivest S., Radzioch D., and Olivier M. 2001. Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, 31(11):3185-96.

Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, et al. 2006. Advantages of realtime PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 137:214–221.

Fruth, Solioz N., and Louis J.A. 1993. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *The Journal of Immunology*, 150:1857-64.

Fujiwara R. T., Vale A. M., Franca da Silva J. C., da Costa R. T., Quetz Jda S., Martins Filho O. A., Reis A. B., Correa Oliveira R., Machado-Coelho G. L., Bueno L. L., Bethony J. M., Frank G., Nascimento E., Genaro O., Mayrink W., Reed S., and Campos-Neto A. 2005. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.* 36, 827–838.

Genaro O., Mayrink W., Michalick M.S.M., Dias M., Da Costa C.A., Melo M.N. 1988. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83, 43.

Ghosh S, Bhattacharyya S, Das S, Raha S, Maulik N, Das DK, Roy S, Majumdar S. 2001. Generation of ceramide in murine macrophages infected with *Leishmania donovani* alters macrophage signaling events

and aids intracellular parasitic survival. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 223(1-2):47-60.

Giunchetti R., Martins-Filho O., Carneiro C. et al. 2008. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 121, no. 1-2, 23–33.

Giunchetti R.C., Correia-Oliveira R., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Roatt B.M., Aguiar-Soares R.D.O., Vitoriano-Souza J., Moreira N.D., Malaquias L.C.C., Castro L.L.M., Lana M., Reis A.B. 2007. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine* 25, 7674–7686.

Gomes-Pereira S., Rodrigues O.R., Santos-Gomes G.M. 2004b. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 95, 63–70.

Gontijo NF, Almeida-Silva S, Costa FF, Mares-Guia ML, Williams P, Melo MN. 1998. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* development. *Exp. Parasitol.* 90(3):212-9.

Gorczynski RM. 1985. Immunization of susceptible BALB/c mice against *Leishmania braziliensis*. II. Use of temperature-sensitive avirulent clones of parasite for vaccination purposes. *Cell Immunol* 94:11–20.

Gradoni L, Gramiccia M. 2000. Leishmaniasis. In: *OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccine*. 4th ed. Paris: Office International des Epizooties, 803–812.

Gradoni L. 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis, in *Proceedings. 2nd Int Canine Leishmaniasis Forum* 7–14.

Gradoni L., Foglia Manzillo V., Pagano A., Piantedosi D., De Luna R., Gramiccia M., Scalone A., Di Muccio T., and Oliva G. 2005. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to

protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected. *Vaccine* 23, 5245–5251.

Gramiccia M. and Gradoni L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*. vol. 35, no. 11-12, pp. 1169–1180.

Guarga J.L., Moreno J., Lucientes J., Gracia M.J., Peribáñez M.A., Alvar J., Castillo J.A. 2000. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res. Vet. Sci.* 69, 249–253.

Guerra L.L., Teixeira-Carvalho A., Giunchetti R.C., Martins-Filho O.A., Reis A.B., Corrêa-Oliveira R. 2009. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 104, 611–622.

Gull K. 2003. Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies. *Curr Opin Microbiol* 6: 365-70.

Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, et al. 1997. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 186:1137–47.

Hailu A., Musa A.M., Royce C., Wasunna M. 2005. Visceral leishmaniasis: New health tools are needed. *PLoS Med.* 2, e211.

Handman E, Schnur LF, Spithill TW, Mitchell GF. 1986. Passive transfer of *Leishmania* lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. *J Immunol* 137: 3608–13.

Hannun Y.A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, vol. 274, no. 5294, 1855–1859.

Hart DT, Coombs GH. 1982. *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp. Parasitol.* 54:397–409.

Hartley M.A., Roneti C., Zangger H., Beverley S. M. and Fasel N. 2012. Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. vol. 2-99.

Hernandez-Ruiz, J. et al. 2010. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e871.

Hill KL. 2010. Parasites in motion: flagellum-driven cell motility in African trypanosomes. *Curr Opin Microbiol* 13: 459-65.

Holm A, Tejle K, Gunnarsson T, Magnusson KE, Descoteaux A, Rasmusson B. 2003. Role of protein kinase C α for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 302(4):653–658.

Holm A, Tejle K, Magnusson KE, Descoteaux A, Rasmusson B. 2001. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cellular Microbiology*. 3(7):439–447.

Huynh C. & Andrews N. W. 2008. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. *Cell. Microbiol.* 10, 293–300.

Ilgoutz SC, McConville MJ. 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* 31: 899-908.

Iniesta L., Gállego M., and Portús M. 2005. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 77–81.

Jiang D, Liang J, Noble PW. 2007. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23:435–61.

Joshi T. et al. 2009. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog.* 5, e1000431.

Junghae M, Raynes JG. 2002. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates *Leishmania donovani* infection in macrophages. *Infection and Immunity*. 70(9):5026–5035.

Karp C.L. et al. 1993. In vivo cytokine profiles in patients with kalaazar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-g. *J. Clin. Invest.* 91, 1644–1648.

Kaye P.M., and Aebischer T. 2011. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clin. Microbiol.Infect.* 17, 1462–1470.

Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. 2006. Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology* 133:S87–S112.

Keenan C.M., Hendricks L.D., Lightne L., Webster H.K., Johnson A.J. 1984a. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet. Pathol.* 21, 74–79.

Kenny E., Mason D., Pombo A., Ramírez F. 2000. Phenotypic analysis of peripheral CD4+ CD8+ T cells in the rat. *Immunology* 101, 178–184.

Kimsey PB, Theodos CM, Mitchen TK, Turco SJ, Titus RG. 1993. An avirulent lipophosphoglycan-deficient *Leishmania major* clone induces CD4+ T cells which protect susceptible BALB/c mice against infection with virulent *L. major*. *Infect Immun* 61:5205–13.

Kontos VJ, Koutinas AF. 1993. Old world canine leishmaniasis. *Comp Cont Ed Pract Vet* 15:949–60.

Koutinas AF, Scott DW, Kontos V, Lekkas S. 1993. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Vet Dermatol* 3:121–30.

Kutzler M.A., Weiner D.B. 2008. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics* 9, 776–788.

Lage R., Oliveira G., Busek S. et al. 2007. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*.

Veterinary Immunology and Immunopathology, vol. 153, no. 1-2, 135–145.

Lainson R., Shaw J.J., 2006. New World leishmaniasis. In: Cox, F.E.G., Wakelin, D., Gillespie, S.H., Despommier, D.D. (Eds.), Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, tenth ed. Parasitology, Hodder Arnold, London, 313–349.

Lamerz AC, Damerow S, Kleczka B, Wiese M, van Zandbergen G, et al. 2010. Deletion of UDP-glucose pyrophosphorylase reveals a UDP-glucose independent UDP-galactose salvage pathway in *Leishmania major*. *Glycobiology* 20:872–82

Landfear SM, Ignatushchenko M. 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 115: 1-17.

Landfear SM, Ullman B, Carter NS, Sanchez MA. 2004. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell* 3: 245-54.

Landfear SM. 2008. Drugs and transporters in kinetoplastid protozoa. *Adv Exp Med Biol* 625: 22-32.

Lanier L.L., Ruitenberg J.J., Phillips J.H. 1986. Human CD3+ T lymphocytes that express neither CD4 nor CD8 antigens. *J Immunol* 136(1):339-44.

Laskay T., van Zandbergen G. & Solbach W. 2003. Neutrophil granulocytes — Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11, 210–214.

Leandro C., Santos-Gomes G.M., Campino L., Romão,P., Cortes S., Rolao N., Gomes-Pereira S., Rica Capela M.J., Abranches P. 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 273–284.

Lemesre J. L., Holzmuller P., Gonçalves R. B., Bourdoiseau G., Hugnet C., Cavaleyra M., and Papierok G. 2007. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP

vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine* 25, 4223–4234.

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. 2003. *Trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* 2: 830-40.

Liew F.Y., Millott S., Parkinson C., Palmer R.M.J., and Moncada S. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *The Journal of Immunology*, 144(12):4794-7.

Liu L, Wang L, Zhao Y, Wang Y, Wang Z, Qiao Z. 2006. Testosterone attenuates p38 MAPK pathway during *Leishmania donovani* infection of macrophages. *Parasitology Research*. 99(2):189–193.

Liu M.A. 2011. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological Reviews*, 239. 62–84.

Lukes J, Hashimi H, Ziková A. 2005. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet* 48: 277-99.

Luz-Ambrósio D, Lee JH, Panigrahi AK, et al. 2009. Spliceosomal proteomics in *Trypanosoma brucei* reveal new RNA splicing factors. *Eukaryot Cell* 8: 990-1000.

MacMicking J., Xie Q.W., and Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 15:323-50.

Maia C, Campino L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158:274–287.

Maia C., Nunes M., Cristóvão J., Campino L. 2010. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Tropica*, vol. 116, no. 3, pp. 193–199.

Maia C., Campino L. 2012. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. Journal of Tropical Medicine, Volume 2012, Article ID 541571, 7 pages

Maldonado RA, Fairlamb AH. 2001. Cloning of a pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 112: 183-91

Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, et al. 1995. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. Vet Parasitol 59:13–21.

Manzillo V.F., Restucci B., Pagano A., Gradoni L., and Oliva G. 2006. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. Veterinary Record, vol. 158, no. 20, 690–694.

Martelli AM, Faenza I, Billi AM, Falà F, Cocco L, Manzoli L. 2003. Nuclear protein kinase C isoforms: key players in multiple cell functions? Histology and Histopathology. 18(4):1301–1312.

Martinez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martinez et al. 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. J Biomed Biotechnol 525241.

Mary C., Auriault V., Faugere B., Dessein A.J. 1999. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8+ and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4+ antigen-specific T cells. Infect. Immun. 67, 5559–5566.

Marzochi M.C., Coutinho S.G., De Souza W.J., De Toledo L.M., Grimaldi Jr. G., Momen H., Pacheco R., Da S., Sabroza P.C., De Souza M.A., Rangel Jr. F.B. 1985. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977–1983). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 80, 349–357.

Mathur RK, Awasthi A, Wadhone P, Ramanamurthy B, Saha B. 2004. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. Nat Med 10:540–4.

- Matsui M., Fukuyama H., Akiguchi I., Kameyama M.** 1989. Circulating CD4+CD8+ cells in myasthenia gravis: supplementary immunological parameter for long-term prognosis. *J. Neurol.* 236, 329–335.
- Matte C., J. F. Marquis J.F., J. Blanchette J. et al.**, Peroxovanadium-mediated protection against murine leishmaniasis: role of the modulation of nitric oxide. *European Journal of Immunology*, 30(9):2555-64.
- McConville MJ, Blackwell JM.** 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem* 266: 15170-9.
- McNeely TB, Rosen G, Londner MV, Turco SJ.** 1989. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochemical Journal.* 259(2):601–604.
- Meade J.C., Hudson K.M., Stringer S.L., Stringer J.R.** 1989. A tandem pair of *Leishmania donovani* cation transporting ATPase genes encode isoforms that are differentially expressed. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 81–91.
- Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, et al.** 2000. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun* 68:5595–602.
- Mendes C. O., Paraguai de Souza E., Borja-Cabrera G. P., Melo Batista L. M., Santos M. A., Parra L. E., Menz I., and Palatnik de Sousa C. B.** 2003. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine* 21, 2589–2597.
- Menezes-Souza D, Corrêa-Oliveira R, Guerra-Sá R, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Oliveira GC, Reis AB.** 2011. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally

infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical Status. *Veterinary Parasitology*, vol. 177, no. 1-2, 39–49.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, et al. 2005. Evaluation of enzyme linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 43:5515–5519.

Michels PA, Hannaert V, Bringaud F. 2000. Metabolic aspects of glycosomes in *Trypanosomatidae* - new data and views. *Parasitol Today* 16: 482-49.

Michels PA, Moyersoen J, Krazy H, et al. 2005. Peroxisomes, glyoxysome and glycosomes. *Mol Membr Biol* 22: 133-45.

Miret J., Nascimento E., Sampaio W., França J. C., Fujiwara R. T., Vale A., Dias E. S., Vieira E., da Costa R. T., Mayrink W., Campos Neto A., and Reed S. 2008. Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of *N*-methyl meglumine antimoniate (Glucantime) and the recombinant Leish-110f+MPL-SE vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 1585–1594.

Moore KJ, Labrecque S, Matlashewski G. 1993. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. *Journal of Immunology*. 150(10):4457–4465.

Morales MA, Watanabe R, Dacher M, Chafey P, Fortea JO, et al. 2010. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:8381–86.

Moreira-Leite FF, Sherwin T, Kohl L, Gull K. 2001. A trypanosome structure involved in transmitting cytoplasmic information during cell division. *Science* 294: 610-2.

- Moreno J, Alvar J.** 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18:399–405.
- Moreno J., Nieto J., Chamizo C., Gonzalez F., Blanco F., Barker D.C., Alvar J.,** 1999. The immune response and PMBC subsets in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 181–195.
- Moreno J., Nieto J., Masina S., Cañavate C., Cruz I., Chicharro C., Carrillo E., Napp S., Reymond C., Kaye P. M., Smith D. F., Fasel N., and Alvar J.** 2007. Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine* 25, 5290–5300.
- Mosser D.M. and Edelson P.J.** 1987. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature.* 327(6120):329-31.
- Muller N, Zimmermann V, Forster U, et al.** 2003. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffinembedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol* 114:223–229.
- Muraille E, Gounon P, Cazareth J, Hoebeke J, Lippuner C, et al.** 2010. Direct visualization of peptide/MHC complexes at the surface and in the intracellular compartments of cells infected in vivo by *Leishmania major*. *PLoS Pathog.* 6:e1001154
- Murray HW.** 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.* 82:249–67.
- Muyombwe A, Olivier M, Harvie P, Bergeron MG, Ouellette M, Papadopolou B.** 1998. Protection against *Leishmania major* challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. *J Infect Dis* 177(1): 188–95.
- Naderer T., Ellis M.A., Sernee M.F., De Souza D.P., Curtis J., et al.** 2006. Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires

the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA

Naderer T., Heng J., McConville M.J. 2010. Evidence that intracellular stages of *Leishmania major* utilize amino sugars as a major carbon source. *PLoS Pathogens* 6:e1001245

Naderer T., Heng J., McConville M.J. 2011. Calcineurin is required for *Leishmania major* stress response pathways and for virulence in the mammalian host. *Mol. Microbiol.* 80:471–80.

Nam K., Akari H., Terao K., Shibata H., Kawamura S., Yoshikawa Y. 2000. Peripheral blood extrathymic CD4+CD8+ T cells with high cytotoxic activity are from the same lineage as CD4+CD8– T cells in cynomolgus monkeys. *Int. Immunol.* 12, 1095–1103.

Nandan D., Lo R., and Reiner N. E. 1999. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen- activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*, 67(8):4055-63.

Ndjamen B., Kang B. H., Hatsuzawa K. & Kima P. E. 2010. *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. *Cell. Microbiol.* 12, 1480–1494.

Newton AC. 1997. Regulation of protein kinase C. *Current Opinion in Cell Biology.* 9(2):161–167.

Nieto C.G., Garcia Alonso M., Requena J.M., Miron C., Soto M., Alonso C., and Navarrete I. 1999. Analysis of the humoral response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 117–130.

Nogueira F.S., Moreira M.A.B., Borja Cabrera G.P., Santos F. N., Menz I., Parra L.E., Xu Z., Chu H.J., Palatnik-de- Sousa CB, Luvizotto MCR. 2005. Leish-mune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in

blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* 23, 4805–4810.

Noyes H., Arana B.A., Chance M.L., Maingon R. 1997. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44, 511–517.

Nylen S. et al. 2007. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 204, 805–817.

Oberholzer M, Lopez MA, McLelland BT, Hill KL. 2010. Social motility in African trypanosomes. *PLoS Pathog* 6(1): e1000739.

Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, et al. 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol* 44:1318–1322.

Opperdoes FR, Borst P. 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* 80: 360-64.

Osorio y Forté A., de La Llave E., Regnault B. et al. 2009. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes. *BMC Genomics*, vol. 10, article 119.

Paape D, Lippuner C, Schmid M, Ackermann R, Barrios-Llerena ME, et al. 2008. Transgenic, fluorescent *Leishmania mexicana* allow direct analysis of the proteome of intracellular amastigotes. *Mol. Cell Proteomics* 7:1688–701.

Palatnik-de-Sousa C. B. 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* 26, 1709–1724.

Palatnik-de-Sousa C. B., Barbosa Ade F., Oliveira S. M., Nico D., Bernardo R. R., Santos W. R., Rodrigues M. M., Soares I., and Borja-Cabrera G. P. 2008. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 7, 833–851.

Palatnik-de-Sousa C. B., Gomes E. M., Paraguai de Souza E., Luz K., Palatnik M., and Borojevic R. 1995. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the Fucose Mannose Ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 390–393.

Palatnik-de-Sousa C. B., Paraguay de Sousa E., Gomes E. M., and Borojevic R. 1994. The FML vaccine (fucose-mannose ligand) protects hamsters from experimental kalaazar. *Braz. J. Assoc. Adv. Sci. Cienc. Cult.* 46, 290–296.

Palatnik-de-Sousa C. B., Silva-Antunes I., Morgado A. A., Menz I., Palatnik M., and Lavor C. 2009. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune[®] in Brazilian endemic areas. *Vaccine* 27, 3505–3512.

Parsons M. 2004. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol* 53: 717-24.

Pinelli E., Gonzalo R.M., Boog C.J.P., Rutten V.P.M.G., del Real G., Ruitenbergh E.J. 1995. *Leishmania infantum*-specific T cells lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility—complex restricted manner. *Eur. J. Immunol.* 25, 1594–1600.

Portman N, Gull K. 2010. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *Int J Parasitol* 40: 135-48.

Portman N, Lacomble S, Thomas B, McKean PG, Gull K. 2008. Combining RNA interference mutants and comparative proteomics to identify protein components and dependencies in a eukaryotic flagellum. *J Biol Chem* 284: 5610-9.

Prina E., Jouanne C., De Souza Lao S., Szabo A., Guillet J.G., and Antoine J.C. 1993. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis amastigotes*. The Journal of Immunology, vol. 151, no. 4, 2050–2061.

Puentes S.M., Da Silva R.P., Sacks D.L., Hammer C.H., and Joiner K.A. 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. Journal of Immunology. 145(12):4311-6.

Puentes S.M., Dwyer D.M., Bates P.A., and Joiner K.A. 1989. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. Journal of Immunology. 143(11):3743-9.

Quinnell R.J., Courtenay O., Garcez L.M., Kaye P.M., Shaw M.A., Dye C., Day M.J. 2003. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 91, 161–168.

Quinnell R.J., Kennedy L.J., Barnes A., Courtenay O., Dye C., Garcez L. M., Shaw M.A., Carter S.D., Thomson W., and Ollier W.E. 2003. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. Immunogenetics 55, 23–28.

Quinnell R., O. Courtenay, M. Shaw *et al.* 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. Journal of Infectious Diseases, vol. 183, no. 9, 1421–1424.

Rafati S., Nakhaee A., Taheri T., Taslimi Y., Darabi H., Eravani D., Sanos S., Kaye P., Taghikhani M., Jamshidi S., and Rad, M. A. 2005. Protective vaccination against canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and type II of *L. infantum*. Vaccine 23, 3716–3725.

Rajcani J., Mosko T., Rezuchova I. 2005. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? Reviews in Medical Virology 15, 303–325.

Ralston KS, Kabututu ZP, Melehani JH, Oberholzer M, Hill KL. 2009. The *Trypanosoma brucei* flagellum: moving parasites in new directions. *Annu Rev Microbiol* 63: 335-62.

Ralton JE, Naderer T, Piraino HL, Bashtannyk TA, Callaghan JM, et al. 2003. Evidence that intracellular β 1–2 mannan is a virulence factor in *Leishmania* parasites. *J. Biol. Chem.* 278:40757–63.

Ramiro M.J., Zárate J.J., Hanke T., Rodriguez D., Rodriguez J.R., Esteban M., Lucientes J., Castillo J.Á., and Larraga V. 2003. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA vaccine and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21, 2474–2484.

Reed SG, Badaro R, Lloyd RM. 1987. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani* chagasi by human infection sera. *J Immunol* 138:1596–601.

Reiner NE, Malemud CJ. 1984. Arachidonic acid metabolism in murine Leishmaniasis (*donovani*): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. *Cellular Immunology.* 88(2):501–510.

Reis A. B., Teixeira-Carvalho A., Vale A. M., Marques M. J., Giunchetti R. C., Mayrink W., Guerra L.L., Andrade R.A., Corrêa-Oliveira R., and Martins-Filho O.A. 2006b. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 102–116.

Reis A., Martins-Filho O., Teixeira-Carvalho A. et al. 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 128, no. 1–3, 87–95.

Reis A.B., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Carvalho M.G., Mayrink W., Franca-Silva J.C., Giunchetti R.C., Genaro O., Correia-Oliveira R. 2006a. Parasite density and impaired biochemical/haematological status are associated with severe clinical

aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81, 68–75.

Reis A.B., Teixeira-Carvalho A., Giunchetti R.C., Guerra L.L., Carvalho M.G., Mayrink W., Genaro O., Correia-Oliveira R., Martins-Filho O.A. 2006c. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immunol.* 146, 303–311.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, et al. 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 40:2352–2356.

Rivier D, Shah R, Bovay P, Mauel J. 1993. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Mol Biochem Parasitol* 152:35–46.

Robinson D.R., Sherwin T., Ploubidou A., Byard E.H., and Gull K. 1995. Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J Cell Biol* 128: 1163–1172.

Rodríguez-Cortés A., Ojeda A., López- Fuertes L., Timón M., Atlet L., Solano-Gallego L., Sánchez-Robert E., Francino, O. and Alberola J. 2007b. Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK, and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25, 7962–7971.

Rosenzweig D, Smith D, Opperdoes F, Stern S, Olafson RW, et al. 2008. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J.* 22:590–602.

Rottembourg D., Filippi C.M., Bresson D., Ehrhardt K., Estes E.A., Oldham J.E., von Herrath M.G. 2010. Essential role for TLR9 in prime but not prime-boost plasmid DNA vaccination to activate dendritic cells and protect from lethal viral infection. *Journal of Immunology.* 184, 7100–7107.

Russell D.G., Xu S., Chakraborty P. 1992. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J. Cell Sci.* 103, 1193–210

Saha B., Das G., Vohra H., Ganguly N.K., and Mishra G.C. 1995. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *European Journal of Immunology*, 25(9):2492-8.

Samanovic M, Molina-Portela MP, Chessler AD, Burleigh BA, Raper J. 2009. Trypanosome lytic factor, an antimicrobial high-density lipoprotein, ameliorates *Leishmania* infection. *PLoS Pathog.*

Sanchez M., Diaz N., Zerpa O., Negron E., Convit J., and Tapia F. 2004. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 70, no. 6, 618–624.

Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, et al. 2005. Polymorphism of SLC11 a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered* 96:755–758.

Santana C., Vassallo J., de Freitas L., Oliveira G., Pontes-de-Carvalho L., and dos-Santos W. 2008. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunology*, vol. 30, no. 10, pp. 515–524.

Santana D.M., Borja-Cabrera G.P., Paraguai de Souza E., Sturm N.R., Palatnik de Sousa C.B., and Campbell D.A. 2002. Nucleosidehydrolase from *Leishmania (L.) donovani* is an antigenodiagnostic for visceral leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 315–319.

Santos W. R., de Lima V. M. F., Paraguai de Souza E., Bernardo R. R., Palatnik M., and Palatnik de Sousa C. B. 2002. Saponins, IL12 and

BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 21, 30–43.

Santos W.R., Aguiar I.A., Paraguai de Souza E., de Lima, V.F.M., Palatnik M., and Palatnik-de-Sousa C. B. 2003. Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* 21, 4668–4676.

Saunders E.C., Chambers J.M., Ng W., Naderer T., Ng M., et al. 2011. Isotopologue profiling of *Leishmania mexicana* promastigotes under glucose replete and starvation conditions. *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print]

Saunders E.C., De Souza D.P., Naderer T., Sernee M.F., Ralton J.E., et al. 2010. Central carbon metabolism of *Leishmania* parasites. *Parasitology*

Schlein, Y. 1986. Sandfly diet and *Leishmania*. *Parasitol. Today* 2, 175–7.

Schneider A, Bursac D, Lithgow T. 2008. The direct route: a simplified pathway for protein import into the mitochondrion of trypanosomes. *Trends Cell Biol* 18: 12-8.

Seger R. and E. G. Krebs E.G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB Journal*, vol. 9, no. 9, 726–735.

Sellon R. 1992. Leishmaniasis in the United States. In: Kirk RW, Bonagura JD, eds. *Kirk's current veterinary therapy XI*. Philadelphia: WB Saunders, 271.

Sharma S., tenOever B.R., Grandvaux N., Zhou G.P., Lin R., Hiscott J. 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, 300, 1148–1151.

Shiddo SA, Aden Mohamed A, Akuffo HO, et al. 1995. Visceral leishmaniasis in Somalia: prevalence of markers of infection and disease manifestations in a village in an endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:361–365.

Shin H. *et al.* 2009. A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 31,309–320.

Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Baceloar O, Carvalho EM, Kubin M, *et al.* 1995. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 181:1527–37.

Slappendel RJ. 1988. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q* 10:1–16.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. 2000. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 90(1-2):37-45.

Solano-Gallego L., Llull J., Arboix M., Ferrer L., Alberola J. 2001b. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 102, 163–166.

Solano-Gallego L., Riera C., Roura X., Iniesta L., Gallego M., Valladares J.E., Fisa R., Castillejo S., Alberola J., Ferrer L., Arboix M., Portus M. 2001a. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.* 96, 265–276.

Spath G.F., Garraway L.A., Turco S.J., and Beverley S.M. 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania* major infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 16, pp. 9536–9541.

Stetson D.B., Medzhitov R. 2006. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93–103.

Strauss-Ayali A., Jaffe C., and Baneth G. 2007. Splenic immune

responses during canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research*, vol. 38, no. 4, pp.547–564.

Stuart K, Panigrahi AK. 2002. RNA editing: complexity and complications. *Mol Microbiol* 45: 591-6.

Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL, Panigrahi AK. 2005. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci* 30: 97-105.

Suni M.A., Ghanekar S.A., Houck D.W., Maecker H.T., Wormsley S.B., Picker L.J., Moss R.B., Maino, V.C. 2001. CD4(+) CD8(dim) T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens. *Eur. J. Immunol.* 31, 2512–2520.

Tang D.C., DeVit M., Johnston S.A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152–154.

Tinoco R. et al. 2009. Cell-intrinsic transforming growth factor- β signaling mediates virus-specific CD8⁺ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity* 31, 145–157.

Titus RG, Gueiros-Filho FJ, de Freitas LA, Beverley SM. 1995. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10267–71.

Travi BL, Osorio Y, Melby PC, et al. 2002. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun* 70:2288–2296.

Tsagozis P., Karagouni E., Dotsika E. 2003. CD8(+) T cells with parasite specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 25, 569–579.

Ulmer J.B., Sadoff J.C., Liu M.A. 1996. DNA vaccines. *Current Opinion in Immunology* 8, 531–536.

Veras P, Brodskyn C, Balestieri F, Freitas L, Ramos A, Queiroz A, et al. 1999. A dhfr-ts *Leishmania major* knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 94:491–6.

Veras P.S.T., Moulia C., Dauget C., Tunis C.T., Thibon M., Rabinovitch M. 1995. Entry and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes within phagolysosome-like vacuoles that shelter *Coxiella burnettii* in Chinese hamster ovary cells. Infect. Immun. 63, 3502–6.

Vercammen F., Fernandez-Perez F.J., del Amo C., and Alunda J.M. 2002. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Westernblot. Acta Trop. 84, 175–181.

Vickerman K. 1969. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. J Cell Sci 5: 163-93.

Virbac. 2011. CaniLeish (R): a primeira vacina na Europa contra a leishmaniose. Available at:

<http://www.pt.scribd.com/doc/56634570/Canileish-revista>

Webster P, Russell DG. 1993. The flagellar pocket of trypanosomatids. Parasitol Today 9: 201-6.

Weiss L., Roux A., Garcia S., Demouchy C., Haeffner-Cavaillon N., Kazatchkine M.D., Gougeon M.L. 1998. Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. J. Infect. Dis. 178, 1158–1162.

Wheeler R.J., Gluenz E. and Gull K. 2011. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology Molecular Microbiology 79(3), 647–662.

Wherry E.J. 2011. T cell exhaustion. Nat. Immunol. 12, 492–499.

Wiese M. 2007. *Leishmania* MAP kinases—familiar proteins in an unusual context. Int. J. Parasitol. 37:1053–62.

Wilson RJ, Denny PW, Preiser PR, et al. 1996. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite. *J Mol Biol* 261: 155-72.

Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465–1468.

Working Group on Research Priorities for Development of Leishmaniasis Vaccines: Costa C. H., Peters N. C., Maruyama S. R., de Brito E. C. Jr., and Santos I. K. 2011. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 29, e943. doi: 10.1371/journal.pntd.0000943

World Health Organization. 2011. *World Health Organization: Leishmaniasis: Background Information.* Available at: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

Wright S.D. and Silverstein S.C. 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *Journal of Experimental Medicine.* 158(6): 2016–2023.

Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 279:39925–32.

Yang DM, Fairweather N, Button LL, McMaster WR, Kahl LP, Liew FY. 1990. Oral *Salmonella typhimurium* (AroA⁻) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J Immunol* 145:2281–5.

Zhang O, Wilson MC, Xu W, Hsu FF, Turk J, et al. 2009. Degradation of host sphingomyelin is essential for *Leishmania* virulence. *PLoS Pathog.*

Zuckermann F.A. 1999. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 55–66.

Zuckermann F.A., Husmann R.J. 1996. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology* 87, 500–512.

