



UNIVERSITÀ DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE
CICLO XXX**

**ATTIVITÀ DI PEPTIDI DI DERIVAZIONE
ANTICORPALE NEI CONFRONTI DI PROTOZOI DI
INTERESSE MEDICO**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Luciano Polonelli

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Stefania Conti

Dottoranda: Claudia Santinoli

Anni 2014/2017

INTRODUZIONE	1
Immunità innata e peptidi antimicrobici naturali.....	1
Peptidi antimicrobici di derivazione anticorpale.....	8
Anticorpi	8
Fenomeno killer dei lieviti e teoria del network idiotipico	10
Ab antiidiotipici microbicidi.....	11
Selezione e caratterizzazione del peptide killer KP	12
Malattie causate da protozoi.....	20
Toxoplasmosi	21
Malaria	23
Leishmaniosi	25
SCOPO DELLA RICERCA.....	29
MATERIALI E METODI	31
Peptidi	31
Valutazione dell'attività di KP nei confronti di tachizoiti extracellulari di <i>Toxoplasma gondii</i>.....	32
Saggio di tossicità di KP nei confronti di cellule Vero.....	32
Effetto di KP sull'invasione e sulla proliferazione intracellulare di <i>T. gondii</i> in cellule Vero.....	32
Valutazione dell'effetto di KP mediante rilevamento del DNA parassitario	33
Saggio di esternalizzazione della fosfatidilserina come indicatore di apoptosi in tachizoiti di <i>T. gondii</i>	35
Saggio TUNEL per lo studio della frammentazione del DNA in tachizoiti di <i>T. gondii</i> .	35
Microscopia confocale a scansione laser per la determinazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) in tachizoiti di <i>T. gondii</i>	36
Microscopia elettronica a trasmissione	38
Valutazione dell'attività di KP e dei peptidi da esso derivati nei confronti di <i>P. falciparum</i>	39
Saggio della lattato deidrogenasi parassitaria in forme asessuate di <i>P. falciparum</i>	39
Saggio della luciferasi in gametociti di <i>P. falciparum</i>	40
Valutazione dell'attività di KP e dei peptidi da esso derivati nei confronti di <i>Leishmania infantum</i> e <i>L. tropica</i>.....	41
Saggio di vitalità di promastigoti di <i>L. infantum</i> e <i>L. tropica</i>	41
Saggio di tossicità dei peptidi selezionati in cellule THP-1	42
Saggio di inibizione dell'infettività di <i>L. infantum</i>	43

RISULTATI	45
Attività di KP nei confronti di tachizoiti extracellulari di <i>Toxoplasma gondii</i>	45
Tossicità di KP nei confronti di cellule Vero.....	45
Effetto di KP sull'invasione e sulla proliferazione intracellulare di <i>T. gondii</i> in cellule Vero.....	46
Effetto di KP sull'infezione da <i>T. gondii</i> in cellule Vero valutato mediante rilevamento del DNA parassitario.....	48
Effetto di KP sull'esternalizzazione della fosfatidilserina come indicatore di apoptosi in tachizoiti di <i>T. gondii</i>	50
Effetto di KP sulla frammentazione del DNA in tachizoiti di <i>T. gondii</i> valutato mediante saggio TUNEL	51
Effetto di KP sul potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) in tachizoiti di <i>T. gondii</i> valutato mediante microscopia confocale a scansione laser	52
Effetto di KP sulla morfologia di tachizoiti di <i>T. gondii</i> evidenziato mediante microscopia elettronica a trasmissione	56
Attività di KP e dei peptidi da esso derivati nei confronti di <i>Plasmodium falciparum</i>. 58	
Effetto dei peptidi sulla vitalità di forme asessuate di <i>P. falciparum</i>	58
Effetto dei peptidi sulla vitalità di gametociti di <i>P. falciparum</i>	58
Attività di KP e dei peptidi da esso derivati nei confronti di <i>L. infantum</i> e <i>L. tropica</i> . 59	
Effetto dei peptidi sulla vitalità di promastigoti di <i>L. infantum</i> e <i>L. tropica</i>	59
Tossicità dei peptidi nei confronti di cellule THP-1	60
Effetto dei peptidi sull'infettività di <i>L. infantum</i>	60
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	63
BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUZIONE

Immunità innata e peptidi antimicrobici naturali

Ancora oggi le malattie da infezione rappresentano una importante causa di morbosità e mortalità nell'uomo. Per la terapia delle malattie ad eziologia batterica è disponibile un'ampia gamma di farmaci, nei confronti dei quali, però, gli agenti patogeni possono sviluppare resistenze che si diffondono progressivamente tanto che, soprattutto negli ultimi anni, si sta assistendo all'emergenza dei cosiddetti "super batteri" [1-3]. Nei confronti di altri agenti eziologici, in particolare miceti e protozoi, i farmaci disponibili sono molto meno numerosi e al problema della possibile emergenza di resistenza si associa quello della efficacia non ottimale e dei molti effetti avversi. Per tutti questi motivi, è generalmente riconosciuta la necessità di trovare nuove molecole, efficaci e sicure, per la terapia delle malattie da infezione. In questo ambito i peptidi antimicrobici (AMP) hanno attualmente un ruolo importante come potenziali candidati per sostituire o affiancare, in terapie di combinazione, gli antimicrobici convenzionali [4].

Un campo di ricerca innovativo nei confronti delle malattie da infezione è inoltre quello delle terapie immunomodulanti, dirette al potenziamento dei meccanismi naturali di difesa dell'organismo ospite, per incrementarne l'efficacia protettiva limitando i danni tissutali dovuti all'infiammazione [5].

L'organismo umano per contrastare le infezioni è dotato di un sistema immunitario che prevede risposte di tipo innato e risposte di tipo adattativo, sebbene si tratti di una suddivisione arbitraria, poiché le due branche dell'immunità sono ampiamente interconnesse e spesso è necessaria l'azione coordinata di entrambe per avere una risposta pienamente efficace.

L'immunità innata rappresenta la prima linea di difesa contro i microrganismi patogeni e comprende prima di tutto le barriere superficiali, meccaniche e fisiche, rappresentate dalla cute e dalle mucose del tratto respiratorio, gastrointestinale e genitourinario, con le loro secrezioni contenenti diverse molecole ad attività antimicrobica. A livello cellulare l'immunità innata è quindi mediata da cellule epiteliali che si trovano sulle superfici e da cellule fagocitarie che risiedono nei tessuti o che sono in circolo, come neutrofili, monociti e macrofagi. A livello molecolare queste cellule sono in grado di riconoscere i microrganismi attraverso recettori di riconoscimento (PRR, pattern recognition receptors) specifici per particolari "firme molecolari", di diversa natura, lipidica, glucidica, proteica o anche acidi

nucleici, appartenenti alle cellule microbiche [6,7]. I PRR sono in grado di riconoscere anche molecole segnale proprie dell'ospite, che sono indicative di malattia o danno cellulare.

Una volta avvenuto il riconoscimento del patogeno da parte di questi recettori, si verifica un'attivazione dei meccanismi di difesa cellulari, con produzione di citochine pro-infiammatorie, che segnalano ad altre cellule la presenza di infezione, reclutano ulteriori cellule immunitarie dal sangue al sito di infezione e inducono risposte sistemiche, come la febbre. Vengono stimolati anche i meccanismi microbicidi dell'immunità innata, tra cui la produzione di specie reattive dell'ossigeno e di AMP, in parte attraverso l'attivazione di cellule fagocitarie.

I meccanismi di difesa dell'immunità adattativa sono invece basati sul riconoscimento di specifiche conformazioni molecolari estranee, gli antigeni (Ag), da parte di linfociti B e T, grazie a specifici recettori superficiali. Per quanto riguarda l'iniziale riconoscimento del patogeno, l'immunità adattativa è strettamente dipendente dalla risposta innata, da cui provengono segnali che guidano la selettiva attivazione ed espansione delle popolazioni di linfociti B e linfociti T. La risposta adattativa è attivata più lentamente (da tre giorni a due settimane) e prevede varie azioni mediate da linfociti T *helper*, la produzione di anticorpi (Ab) da parte di linfociti B, l'uccisione di cellule infettate da parte di linfociti T citotossici e lo sviluppo di linfociti di memoria, in grado di fornire una specifica protezione nel corso del tempo nei confronti di eventuali successive infezioni causate dallo stesso patogeno.

Gli AMP naturali, che possiedono attività antimicrobica, antivirale e immunomodulante, sono parte integrante dell'immunità innata. Ne sono stati ritrovati rappresentanti in tutte le forme di vita, dai batteri ai mammiferi [8-11]. Tali peptidi possono essere espressi costitutivamente o essere prodotti in risposta all'esposizione a microrganismi estranei, essere diffusi a livello sistemico o essere localizzati in specifici tipi cellulari o tissutali, maggiormente soggetti alle infezioni da parte di patogeni.

Gli AMP possono esercitare una vasta gamma di attività immunomodulanti, tra cui stimolazione della chemiotassi di leucociti e di cellule dendritiche immature, induzione della differenziazione di cellule immunitarie e iniziazione dell'immunità adattativa, stimolazione al rilascio di istamina da parte di mastociti, stimolazione della produzione di chemochine, inibizione del rilascio di citochine pro-infiammatorie e azione diretta sull'endotossina batterica, prevenendo così i possibili danni causati dall'infiammazione e la sepsi [12].

In **Figura 1** sono illustrate le attività di AMP in grado di influenzare i processi infiammatori [10].

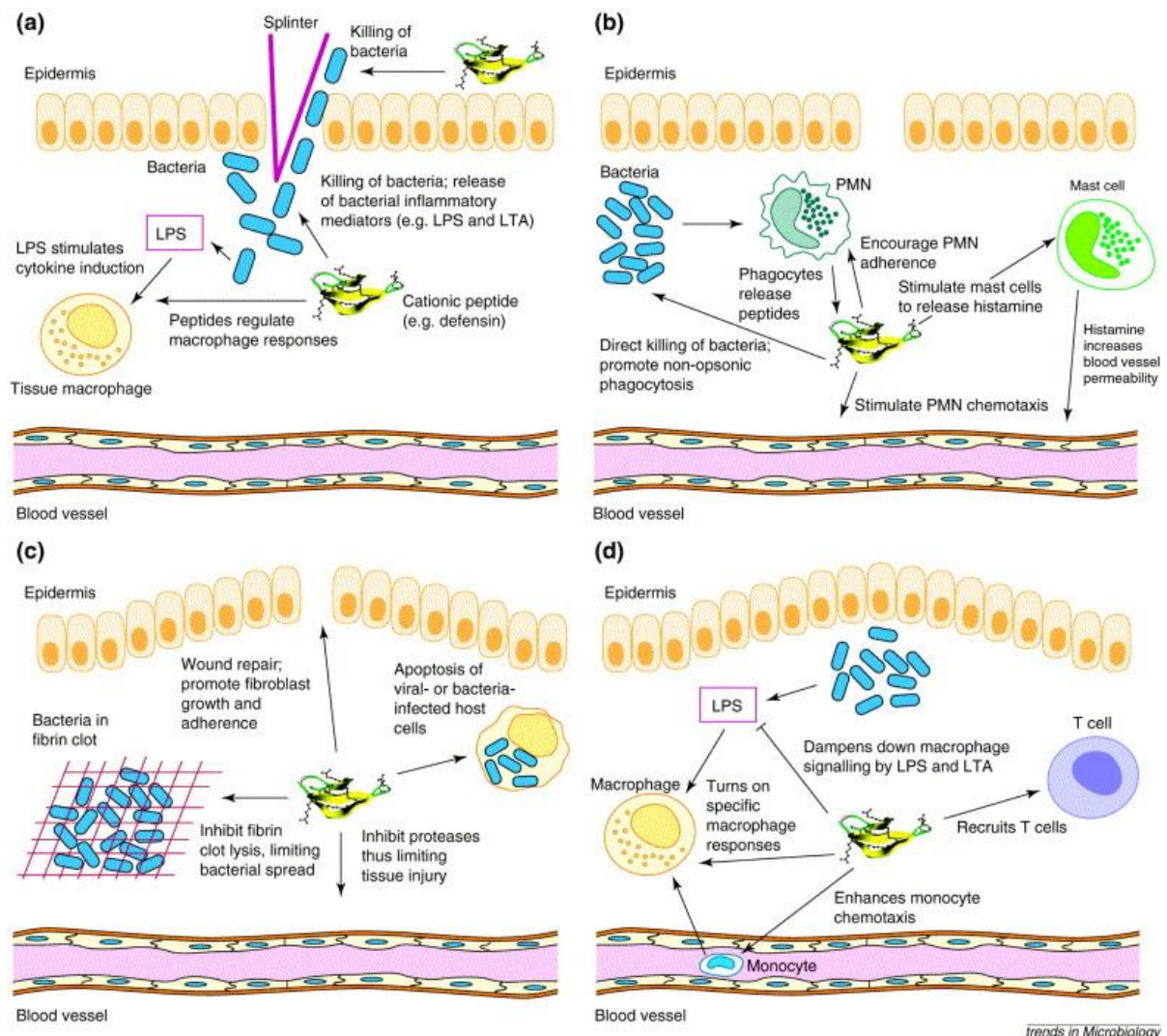


Figura 1. Possibile ruolo di peptidi antimicrobici cationici nell'infiammazione acuta (a-c) e cronica (d). A seguito della penetrazione di batteri, dovuta ad esempio ad un trauma, il peptide (esemplificato nell'immagine da una defensina), oltre che agire direttamente sui microrganismi uccidendoli, può regolare la produzione di citochine da parte dei macrofagi, indotta dal lipopolisaccaride (LPS) rilasciato da batteri uccisi (a); può stimolare la chemiotassi dei polimorfonucleati (PMN), indurre il rilascio di istamina dai mastociti, il che aumenta la permeabilità dei vasi sanguigni (b); può indurre apoptosi di cellule infettate da virus o batteri intracellulari, inibire proteasi così da limitare il danno tissutale, inibire la lisi della fibrina limitando la diffusione batterica, promuovere crescita e adesione dei fibroblasti per la riparazione di ferite (c); può inoltre incrementare la chemiotassi di monociti, indurre risposte macrofagiche specifiche e reclutare linfociti T (d) [10].

Ad oggi, quasi 3000 peptidi antimicrobici naturali sono compresi nell'Antimicrobial Peptide Database [13]. Gli AMP naturali sono costituiti generalmente da 10-50 amminoacidi,

possiedono da 2 a 11 residui carichi positivamente, contengono circa il 50% di residui idrofobici [14-16] e possono essere suddivisi in classi a seconda della loro struttura secondaria, ad α -elica, quali LL-37 e lattoferrina umana, con due o quattro foglietti β , come le defensine, e con struttura estesa (*random-coil*), come l'indolicidina (**Figura 2**) [17,18].

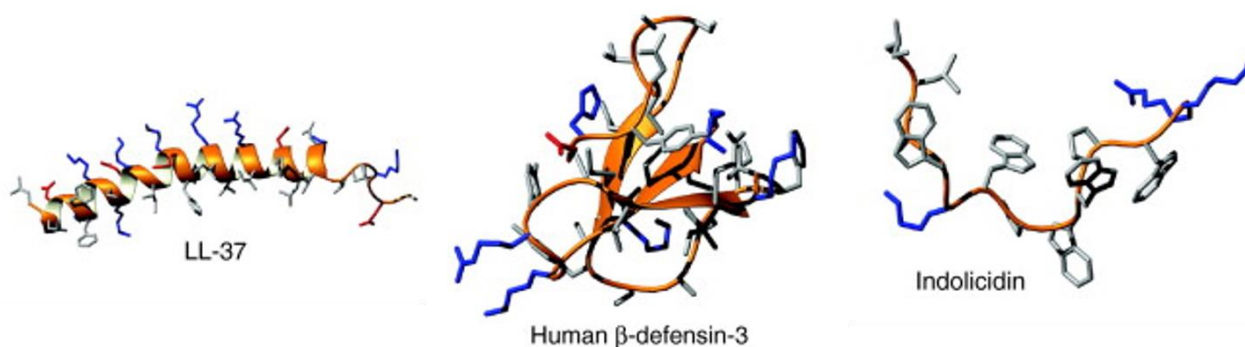


Figura 2. Struttura di peptidi appartenenti alle principali classi di AMP. LL-37 ad α -elica; β -defensina 3 umana a foglietto β e indolicidina a struttura estesa. Le strutture sono state ricavate in spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR). I domini delle catene carichi positivamente sono colorati in blu, quelli negativi in rosso, i rimanenti in grigio. Modificata da [18].

L'interazione tra AMP e microrganismi avviene a livello della membrana cellulare, tramite forze elettrostatiche, soprattutto forze di van der Waals e interazioni idrofobiche, che si instaurano tra le cariche positive dei peptidi e quelle anioniche del doppio strato lipidico dei batteri [19]. Nella maggior parte dei casi gli AMP causano distruzione della membrana, ma studi più recenti hanno dimostrato che alcuni AMP sono in grado di esplicare la loro attività antimicrobica anche attraverso altri meccanismi, tra cui inibizione della respirazione cellulare, inibizione della formazione della parete cellulare, inattivazione di proteine batteriche e induzione di apoptosi nei lieviti [11].

I peptidi cationici esplicano la loro attività biologica legandosi ai fosfolipidi della membrana citoplasmatica. In presenza di un basso rapporto peptide/lipidi gli AMP si orientano parallelamente alla membrana, inserendosi all'interfaccia tra le teste idrofiliche e le catene lipidiche idrofobiche. Se il rapporto aumenta i peptidi iniziano a disporsi perpendicolarmente rispetto al doppio strato lipidico, vi si inseriscono e aggregandosi o dislocando i lipidi provocano la distruzione della membrana con formazione di pori transmembrana, alterazione del gradiente protonico, fuoriuscita di metaboliti dalla cellula, blocco della produzione di ATP e infine morte cellulare [11].

Tale fenomeno è stato descritto mediante tre diversi modelli: modello *barrel-stave*, modello *carpet* e modello *toroidal-pore* [19,20].

Nel modello *barrel-stave* i peptidi, in forma monomerica, si inseriscono perpendicolarmente nel doppio strato della membrana ed iniziano ad aggregarsi disponendosi in un fascio, a mo' di barile composto da peptidi elicoidali come doghe, e portando alla formazione di un poro transmembrana, in cui i domini idrofobici dei peptidi si allineano con il core lipidico e i domini idrofilici costituiscono la porzione interna del poro (**Figura 3**).

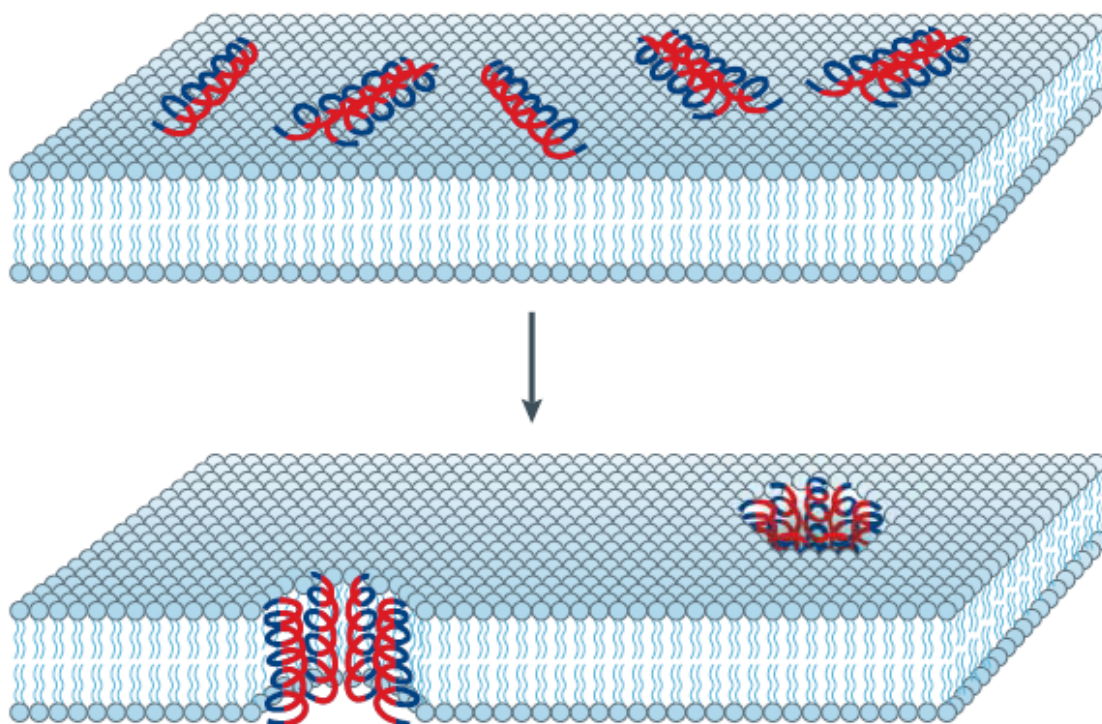


Figura 3. Modello *barrel-stave* di meccanismo d'azione antimicrobica di AMP: i peptidi si aggregano e si inseriscono perpendicolarmente nel doppio strato della membrana formando un poro in cui i domini idrofilici delimitano il poro stesso. Le regioni idrofiliche del peptide sono colorate in rosso, quelle idrofobiche in blu. Modificata da [19].

Il modello *carpet* prevede l'adsorbimento e l'accumulo dei peptidi sulla superficie della membrana, che ricoprono come un tappeto; si presume che, ad alte concentrazioni, i peptidi distruggano il doppio strato lipidico agendo come detergenti, portando alla formazione di micelle (**Figura 4**).

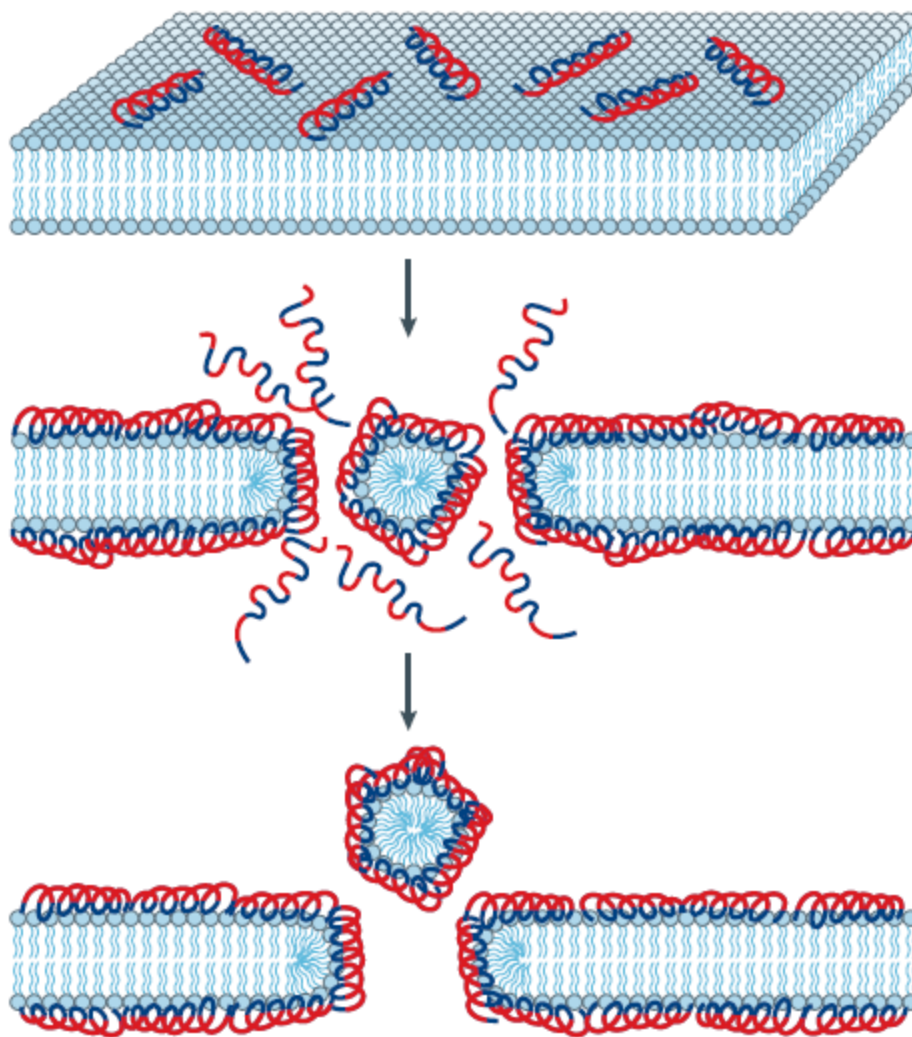


Figura 4. Modello *carpet* di meccanismo d'azione antimicrobica di AMP. In questo modello i peptidi distruggono la membrana orientandosi parallelamente alla superficie del doppio strato lipidico e formando un ampio strato (tappeto). Le regioni idrofiliche del peptide sono colorate in rosso, quelle idrofobiche in blu. Modificata da [19].

Secondo il modello *toroidal-pore* invece, i peptidi si aggregano e si inseriscono in maniera perpendicolare alla membrana, inducendo un ripiegamento delle strutture lipidiche con conseguente formazione di un poro (**Figura 5**). I lipidi si ripiegano rispetto alla normale struttura lamellare e connettono i due foglietti della membrana formando una curva continua dall'alto al basso nella forma di un foro toroidale [10,18,19]. Le superfici interne di questo poro toroidale sono costituite dalle regioni idrofiliche dei peptidi e dai gruppi polari fosfolipidici che essi hanno legato. Il modello toroidale differisce da quello *barrel-stave*

perché i peptidi sono sempre associati alle teste fosfolipidiche anche quando sono inseriti perpendicolarmente nel doppio strato della membrana.

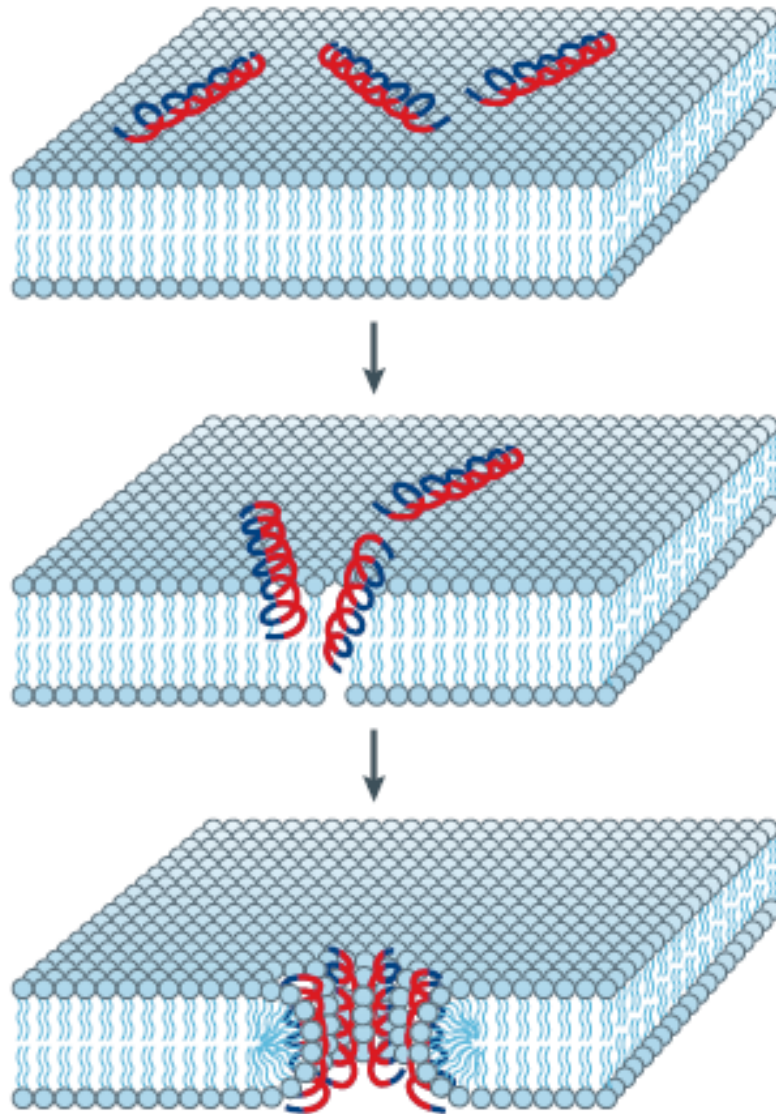


Figura 5. Modello *toroidal-pore* di meccanismo d'azione antimicrobica di AMP. In questo modello i peptidi si aggregano e inducono i monostrati lipidici a ripiegarsi attraverso il poro cosicché la parte interna di esso risulta delimitata sia dai peptidi inseriti che dalle teste polari fosfolipidiche. Le regioni idrofiliche del peptide sono colorate in rosso, quelle idrofobiche in blu. Modificata da [19].

L'attività antimicrobica di altri peptidi invece non si basa sulla distruzione della membrana cellulare, ma sull'interazione con altri componenti cellulari [21,22]. Diversi meccanismi sono stati proposti: associazione con componenti della parete cellulare [23], inibizione della formazione di nuova parete cellulare [24], inibizione della produzione di chaperonine [25],

inibizione della respirazione cellulare [26] e alterazione della trascrizione di più geni batterici [27].

Peptidi antimicrobici di derivazione anticorpale

Recentemente anche peptidi derivati da Ab sono stati studiati per le loro proprietà antimicrobiche. Ormai da molti anni il gruppo di ricerca guidato dal Prof. Polonelli, presso l'Università degli Studi di Parma, si occupa della valutazione delle attività biologiche, principalmente antimicrobiche ed antivirali, ma anche immunomodulanti ed anti-tumorali, di peptidi sintetici con sequenza uguale a frammenti di Ab a diversa specificità. Dopo la prima descrizione di un decapeptide killer (KP), derivato da un Ab antiidiotipico ricombinante immagine interna funzionale di una tossina killer di lievito ad ampio spettro d'azione antimicrobica, gli studi successivi hanno riportato numerose attività biologiche di peptidi derivati dalle regioni variabili e costanti di diversi Ab umani e murini, a prescindere dalla loro specificità ed isotipo, tanto da far considerare gli Ab stessi come una inesauribile fonte di peptidi anti-infettivi ed anti-tumorali [28].

Anticorpi

Gli Ab, o immunoglobuline (Ig), sono molecole glicoproteiche che svolgono un ruolo fondamentale nella difesa adattativa dell'organismo.

La struttura di base degli Ab è tetramerica, con due catene pesanti (H) e due catene leggere (L), legate da ponti disolfuro, ciascuna delle quali costituita da porzioni costanti (C) e variabili (V), situate rispettivamente all'estremità C- e N-terminale (**Figura 6**). Le regioni costanti hanno la funzione di mediare l'interazione con cellule del sistema immunitario e con il complemento, mentre in corrispondenza di V_H e V_L sono localizzati i siti leganti l'Ag. Nell'ambito di ogni regione variabile sono presenti tre regioni ipervariabili, note come *Complementarity Determining Regions* (CDR), $H_{1,2,3}$ e $L_{1,2,3}$, che prendono contatto diretto con il determinante antigenico, e quattro regioni cornice (*Frame Regions*), $FR_{1,2,3,4}$, con sequenza amminoacidica più conservata, che agiscono stabilizzando i CDR nel legame con l'Ag, assicurando la specificità di legame. Il CDR H_3 , ossia il terzo CDR presente sulla catena H, è caratterizzato da una estrema variabilità di sequenza e di lunghezza e sembra essere in gran parte responsabile del riconoscimento dell'Ag, mentre gli altri CDR hanno sequenza più

conservata e sembrano essere coinvolti nell'aumentare la specificità di legame, determinata da un numero limitato di amminoacidi.

Gli Ab riconoscono e legano in maniera selettiva epitopi antigenici di molecole proteiche o polisaccaridiche estranee, e possono agire direttamente, come nel caso della neutralizzazione di tossine o virus, o indirettamente, grazie alle loro funzioni effettrici, portando ad attivazione del complemento, opsonizzazione e citotossicità cellulo-mediata.

Gli Ab stessi, grazie alla loro struttura e natura chimica, risultano essere caratterizzati da tre differenti determinanti antigenici:

- isotipici: localizzati in corrispondenza di C_H , presenti in tutti gli Ab di una determinata classe di una determinata specie;
- allotipici: localizzati in corrispondenza di C_H e C_L degli Ab di gruppi della stessa specie;
- idiotipici (Id): localizzati in corrispondenza di V e specifici di ciascuna molecola anticorpale.

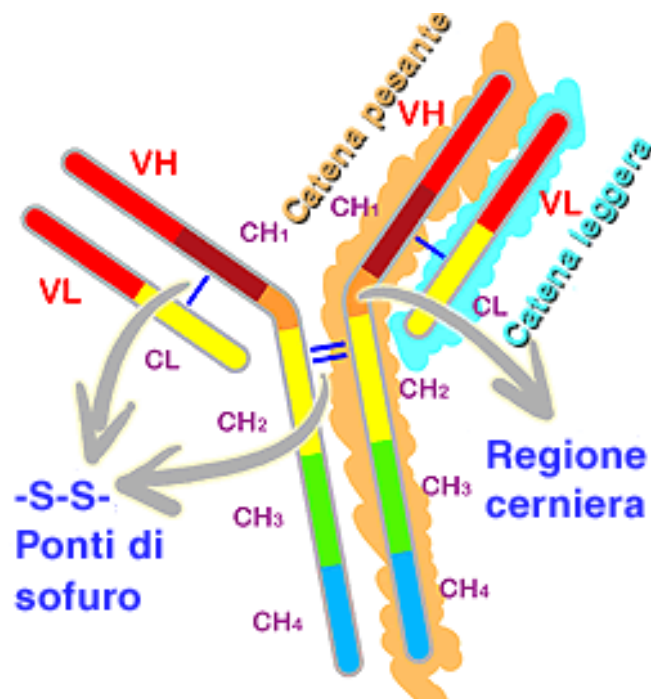


Figura 6. Rappresentazione schematica di un Ab. Caratteristica forma a Y, in cui si riconoscono due catene pesanti (H) e due catene leggere (L) suddivise in regioni variabili (V) e costanti (C). Le catene sono unite da ponti disolfuro.

Negli ultimi decenni gli Ab, in particolare nelle loro forme monoclonale (mAb) e ricombinante (rAb), sono emersi come una importante classe di agenti terapeutici biologici, impiegati soprattutto nel campo dei tumori, delle malattie autoimmuni e infettive [29-31].

Fenomeno killer dei lieviti e teoria del network idiotipico

Fin dal 1960 il fenomeno killer dei lieviti è stato studiato sia per l'interesse biologico, sia come possibile fonte di nuovi agenti antimicrobici [32]. Il fenomeno si basa sulle tossine killer (KT), esotossine di natura glicoproteica prodotte da una grande varietà di lieviti, in grado di uccidere cellule microbiche della stessa specie o di specie diverse. L'attività di KT si esplica attraverso l'interazione con specifici recettori della parete cellulare (KTR) e, caratteristicamente, i ceppi di lieviti produttori di KT sono immuni alla tossina da essi prodotta [33,34].

Mentre alcune KT hanno trovato qualche applicazione pratica, ad esempio per la biotipizzazione di ceppi di lieviti, il loro potenziale uso come farmaci antimicrobici è stato limitato dalle caratteristiche di instabilità a valori di pH e temperatura fisiologici, tossicità, antigenicità e sensibilità a proteasi [35,36]. Per superare questi problemi è stato ipotizzato di generare derivati immunologici di KT, secondo la teoria del *network* idiotipico. Secondo tale teoria, la produzione di Ab nei confronti di un certo Ag è accompagnata dalla produzione di Ab antiidiotipici, la cui regione V può rappresentare l'immagine interna dell'Ag originale e, in alcune circostanze, può anche mimarne l'attività biologica [37].

In particolare, nell'applicazione al fenomeno killer di lievito, l'interazione tra epitopi funzionali di una KT e specifici KTR della parete cellulare in lieviti sensibili potrebbe essere rispecchiata dal legame tra l'idiotipo di Ab neutralizzanti KT e i corrispondenti Ab antiidiotipici, postulando che questi ultimi possano mimare KT, anche dal punto di vista funzionale, dimostrando attività fungicida (Ab killer o antibiocorpi, KAb) [38]. Questa ipotesi è stata verificata utilizzando un Ab monoclonale (mAb KT4) neutralizzante una KT (WaKT) di *Pichia anomala*, ora denominata *Wickerhamomyces anomalus*, ad ampio spettro microbica per interazione con KTR costituiti principalmente da β -1,3-D-glucano della parete cellulare di microrganismi sensibili. Ab antiidiotipici indotti da mAb KT4 hanno mostrato attività candidacida, basata sul legame con KTR, proprio come KT [38]. Altri autori hanno successivamente confermato la possibilità di ottenere Ab antiidiotipici funzionali in modelli diversi di KT di lieviti [39,40].

Ab antiidiotipici microbicidi

Sono stati descritti KAb in grado di uccidere direttamente microrganismi sensibili in quanto immagine interna del sito attivo di WaKT di [41]. KAb sierici e secretori sono stati rilevati in condizioni sperimentali a seguito di vaccinazione idiotipica parenterale e intravaginale con mAb KT4, Ab neutralizzante la tossina, e ne è stata dimostrata l'attività candidacida *in vitro* e l'immunoprotezione nel modello murino nei confronti di candidosi sistemica e vaginale [42,43]. KAb sono stati ritrovati anche nel fluido vaginale di donne con candidosi e di animali infettati sperimentalmente con cellule di *C. albicans* presentanti KTR per WaKT, ossia β -1,3-glucani [44]. È stata dimostrata, inoltre, una protezione anti-*Candida* a seguito di trasferimento passivo di KAb in animali sia immunocompetenti sia immunodeficienti. KAb in grado di fornire immunoprotezione potrebbero quindi rappresentare una classe anticorpale prodotta in risposta a infezioni o a immunizzazione con microrganismi presentanti KTR. [45]. In *C. albicans* i β -1,3-glucani, che costituiscono per la maggior parte i KTR di WaKT, sono preferenzialmente espressi sulla superficie di cellule in germinazione, e in particolare a livello dei tubuli germinativi, dove sono temporaneamente esposti durante la sintesi della parete [46]. È stato dimostrato che Ab anti- β -1,3-glucani hanno un importante ruolo di immunoprotezione, infatti la somministrazione di una vaccino sperimentale costituito da laminarina (un β -1,3-glucano solubile) coniugata al tossoide difterico ha mostrato di conferire protezione in animali nei confronti non solo di candidosi vaginale e sistemica ma anche di aspergillosi sistemica. Analogamente, Ab monoclonali e policlonali anti- β -1,3-glucani si sono dimostrati protettivi a seguito di trasferimento passivo in animali non immunizzati, oltre a mostrare una significativa attività microbica *in vitro* nei confronti di *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* [47-49]. Gli stessi Ab umanizzati sono stati prodotti anche in piante, per un loro potenziale utilizzo come agenti terapeutici contro infezioni fungine [50].

L'applicazione terapeutica di Ab è però limitata da problematiche di antigenicità, sicurezza, possibile tossicità e particolare farmacocinetica. Alcune di queste limitazioni possono essere ridotte attraverso l'umanizzazione di mAb murini (Ab chimerici) o con la produzione di mAb umani. In seguito alla constatazione che la specificità anticorpale è strettamente legata alla presenza di pochi residui amminoacidici, per superare il problema delle dimensioni si possono ottenere molecole più piccole ancora in grado di esplicare le proprietà di legame della molecola intera e dotate di buona stabilità, solubilità e capacità di penetrazione nei tessuti *in vivo* [51-57].

Selezione e caratterizzazione del peptide killer KP

Sulla base della sequenza della regione V di un KAb antiidiotipico ricombinante a singolo filamento (scFv H6), immagine interna di WaKT, sono stati individuati i peptidi rappresentanti i sei CDR e una serie di decapeptidi parzialmente sovrapposti per riprodurre l'intera porzione V dell'Ab. Molti di questi peptidi, prodotti per sintesi, hanno mostrato una importante attività fungicida *in vitro* nei confronti di un ceppo di riferimento di *C. albicans*, scelto come modello di microrganismo sensibile, risultando mimotopi funzionali di KT.

In particolare, il decapeptide P6 (EKVTMTCSAS), i cui residui SAS corrispondono ai primi tre amminoacidi di CDR L₁, si è dimostrato tra i più attivi. Attraverso un processo di *alanine scanning* è stato ottenuto un decapeptide (KP, AKVTMTCSAS), derivato dalla sostituzione dell'acido glutammico in posizione iniziale di P6 con l'alanina, caratterizzato da un rilevante e significativo aumento di attività candidacida *in vitro* [58].

La metodologia utilizzata per ottenere KP è schematicamente illustrata in **Figura 7**.

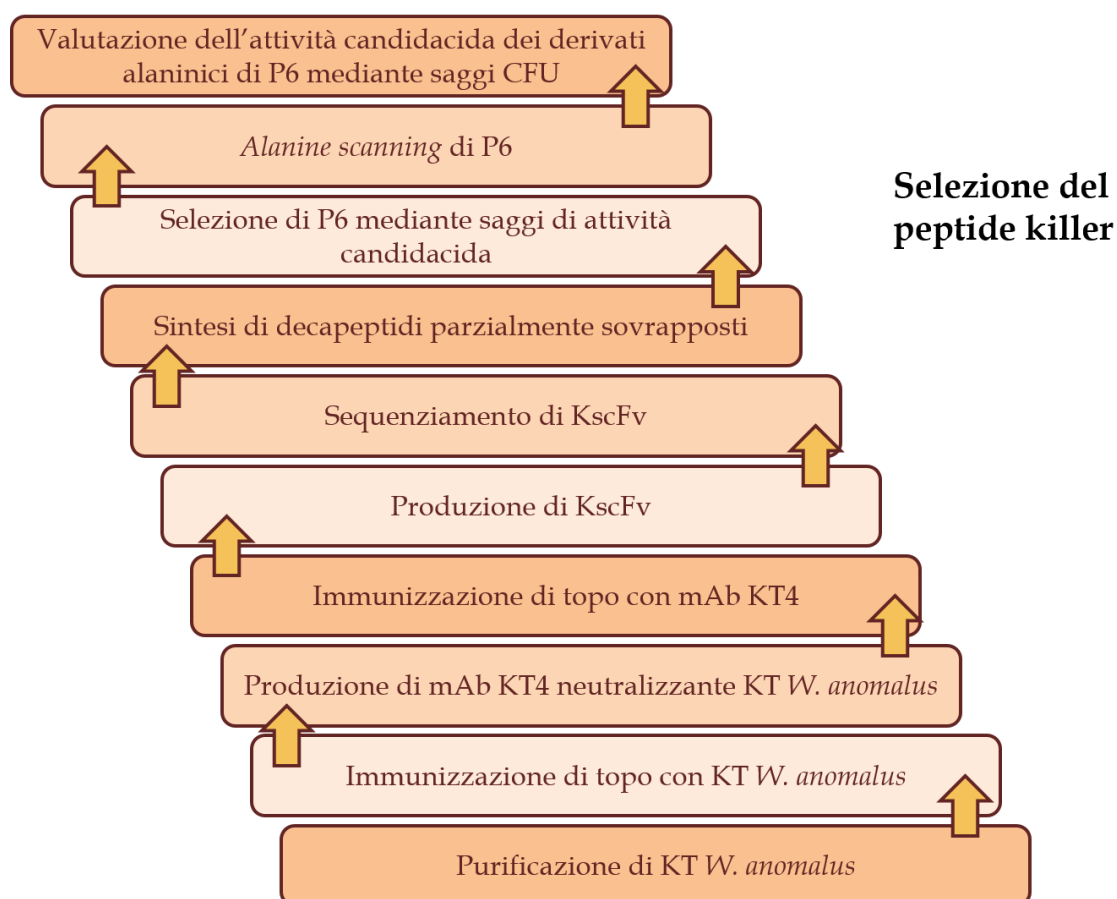


Figura 7. Rappresentazione schematica della metodologia utilizzata per ottenere KP a partire dalla tossina di *W. anomalus*.

Il peptide KP ha mostrato possedere diverse attività elencate in seguito:

a) Attività antifungina

KP ha mostrato una significativa attività antifungina *in vitro* nei confronti di un ampio numero di ceppi clinici appartenenti a specie del genere *Candida*, come *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, indipendentemente dalla loro sensibilità o resistenza a farmaci antifungini convenzionali [59]. In particolare, l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di cellule di *C. albicans* sottoposte all'azione di KP ha permesso di rilevare diverse alterazioni cellulari, tra cui rigonfiamento della parete, collasso della membrana plasmatica, condensazione e frammentazione del materiale nucleare (**Figura 8**).



Figura 8. Immagini TEM degli effetti citotossici di KP nei confronti di *C. albicans*. Cellule di lievito trattate con KP (a sinistra) mostrano significative alterazioni morfologiche: rigonfiamento della parete, collasso della membrana plasmatica, condensazione della cromatina e frammentazione nucleare. Cellule trattate con un peptide SP irrilevante (a destra) non mostrano tali alterazioni, in maniera analoga a cellule non trattate (non mostrate) [38].

Una significativa attività *in vitro* è stata dimostrata anche nei confronti di ceppi, sia capsulati sia acapsulati, di *C. neoformans*, un patogeno opportunistico fungino responsabile di gravi infezioni in individui immunocompromessi. KP è stato in grado di indurre una riduzione della produzione di specifici fattori di virulenza, come capsula, proteasi e ureasi extracellulari. Quando somministrato a topi con infezione sperimentale sistemica, KP ha mostrato una rilevante attività terapeutica, determinando un aumento della sopravvivenza dell'animale e

una riduzione del carico fungino e della formazione della capsula nel cervello, principale organo bersaglio [60].

Simile attività è stata riscontrata *in vitro* nei confronti di *Paracoccidioides brasiliensis*, agente responsabile di paracoccidioidomicosi, principale micosi sistemica nel Sud America [61].

b) Attività antibatterica

KP ha dimostrato una significativa attività antibatterica *in vitro* nei confronti di un ampio spettro di ceppi batterici rilevanti dal punto di vista epidemiologico, compresi ceppi multiresistenti, sia Gram-positivi, sia Gram-negativi, appartenenti a specie dei generi *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *P. aeruginosa*, enterobatteri e *Leptospira* [62] e di fitopatogeni, quali *P. syringae* ed *Erwinia carotovora* [63].

Quando prodotto in piante di tabacco (*Nicotiana benthamiana*), utilizzando un sistema di espressione chimerico basato su *Potato virus X* (PVX), KP si è dimostrato in grado di conferire alle piante che lo esprimevano una aumentata resistenza nei confronti di infezioni sperimentali da *P. syringae* [63].

I meccanismi alla base dell'attività antibatterica di KP non sono ancora stati chiariti, tuttavia si ritengono fondamentali le sue proprietà chimico-fisiche e le sue interazioni con strutture simil-glucano sulla superficie delle cellule o con altre molecole non ancora identificate.

c) Attività antiprotozoaria

KP ha dimostrato di poter uccidere *in vitro* protozoi epidemiologicamente rilevanti, quali *Leishmania major* e *L. infantum* e *Acanthamoeba castellanii* [64,65]. In particolare, KP ha dimostrato attività antiproliferativa e leishmanicida *in vitro* nei confronti della forma replicativa (promastigote) di specie di *Leishmania*, determinando la comparsa di alterazioni morfologiche ultrastrutturali di organelli citoplasmatici, la disorganizzazione della cromatina nucleare e del cinetoplasto, l'ispessimento della membrana nucleare e la tumefazione dei mitocondri, tutti effetti che suggeriscono una degenerazione autofagica della cellula [64]. KP si è inoltre dimostrato in grado di uccidere *in vitro*, in maniera dose-dipendente, trofozoiti di *A. castellanii*, agente eziologico di cheratiti in particolare in portatori di lenti a contatto.

La presenza di β -1,3-glucani sulla superficie cellulare dei protozoi, come confermato dalla loro sensibilità all'enzima laminarinasi, una β -1,3-glucanasi, potrebbe essere ancora una volta alla base del meccanismo d'azione antiprotozoario di KP.

d) Attività antivirale

KP ha dimostrato una rilevante attività nei confronti del virus dell'immunodeficienza umana HIV-1 e del virus dell'influenza A [66,67].

È stato riconosciuto che il peptide possiede omologia di sequenza con segmenti critici delle anse V1/V2 e V3 della gp160 di HIV-1, coinvolte nel legame con il recettore e/o con il co-recettore. Ciò potrebbe essere alla base della capacità di KP di inibire la replicazione del virus in diversi tipi di cellule, quali cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) di pazienti in fase acuta d'infezione (*ex vivo*), PBMC di donatori sani infettate *in vitro* con un ceppo linfocitotropico X4 o monocitotropico R5 e linee cellulari di astroglioma trasfettate con CD4-CCR5 o CD4-CXCR4 e infettate *in vitro*. L'attività antiretrovirale di KP, a concentrazioni micromolari, si è dimostrata più potente di quella del farmaco convenzionale azidotimidina e sembra essere correlata alla *down-regolazione* del co-recettore CCR5 e/o al blocco fisico della interazione gp120-recettore [66].

Nel caso del virus dell'influenza A, dopo trattamento con KP di cellule sperimentalmente infettate è stata osservata una marcata riduzione della sintesi di proteine virali tardive, in particolare M1 ed HA. In questo caso l'attività antivirale è stata dimostrata *in vitro* nei confronti di un ceppo neurotropico umano H1N1, un ceppo di isolamento clinico umano H3N2 amantadina-resistente, e due ceppi aviari H7N1 e H7N3. In modelli murini infettati con H1N1, a seguito del trattamento con KP, è stato osservato un aumento della sopravvivenza dell'animale e una riduzione del titolo virale nei polmoni [67].

e) Attività immunomodulante

KP ha dimostrato di interagire con cellule dell'immunità. In particolare, il peptide ha mostrato di legare selettivamente, in modo tempo- e dose-dipendente, cellule dendritiche murine, e in minor misura macrofagi, tramite interazione con molecole CD16/32 del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II) ed altre molecole di adesione intercellulare. E' stato osservato che il trattamento con KP è in grado di modulare l'espressione di molecole costimolatorie e di MHC sulle cellule dendritiche recettori e di migliorare la loro capacità di indurre la proliferazione di linfociti [68].

In **Figura 9** sono riportati in maniera schematica i ceppi e le cellule nei confronti dei quali KP esercita le proprie attività antibatterica, antifungina, antivirale, antiprotozoaria e immunomodulante [69].

La maggior parte delle attività biologiche di KP sembra poter essere ricondotta alla sua struttura e ad alcune proprietà chimico-fisiche che lo caratterizzano. Esso è molto stabile in forma liofilizzata e, quando solubilizzato in condizioni non riducenti, dimerizza facilmente per formazione di ponti disolfuro intermolecolari tra i residui di cisteina in posizione 7. La forma dimerica rappresenta l'unità funzionale, infatti il peptide appena solubilizzato, quando

prevale la forma monomerica, non mostra alcuna attività, ma, dopo circa 24 ore, quando la maggior parte del peptide è dimerizzato, si osserva attività candidacida [70]. Inoltre, la sostituzione del residuo di cisteina con serina determina la perdita di attività.

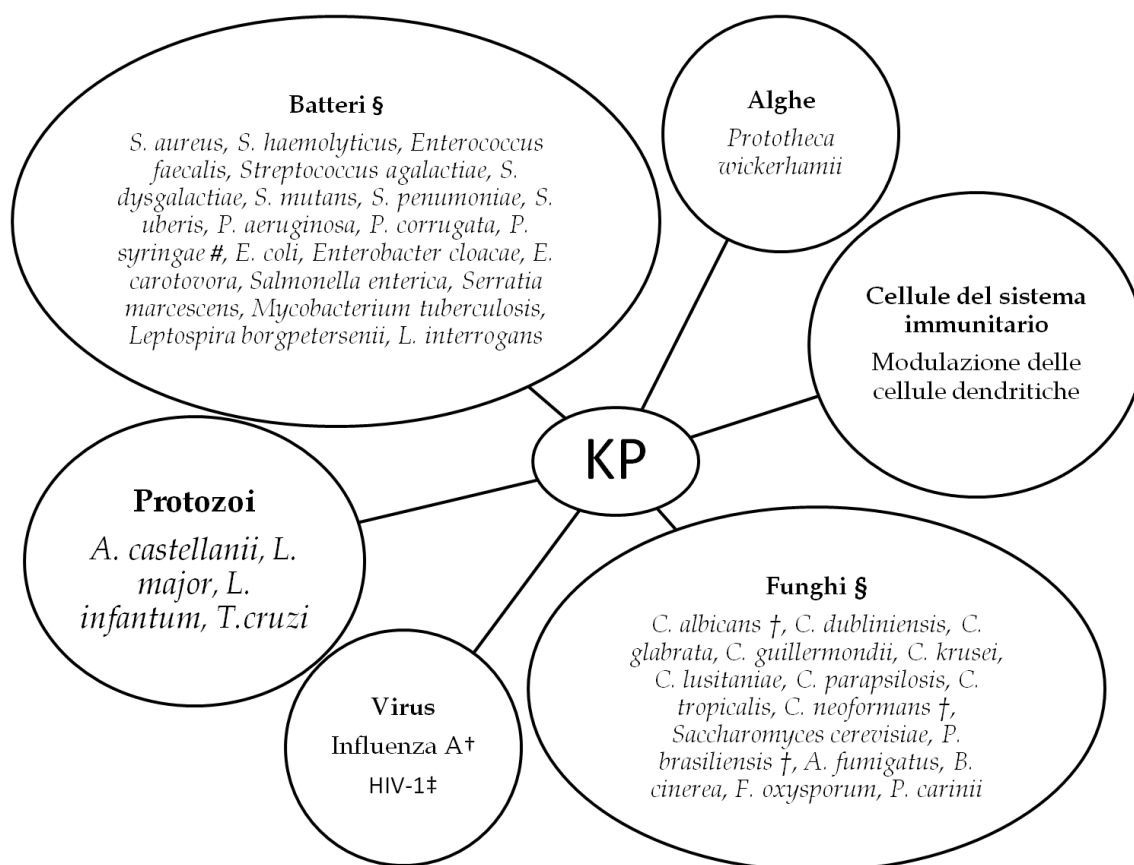


Figura 9. Attività di KP *in vitro*, *in vivo* (†), *ex vivo* (‡), *in planta* (#), inclusi ceppi antibiotico-resistenti (§) [69].

Studi di dicroismo circolare (DC) hanno permesso di stabilire che subito dopo la solubilizzazione KP, sia forma monomerica sia dimerica, presenta uno spettro riconducibile a una conformazione *random-coil* con presenza di una banda negativa intorno a 200 nm. Col passare del tempo, tuttavia, si osserva una progressiva evoluzione strutturale verso una conformazione a foglietto β (bande progressivamente positive a circa 200 nm) come conseguenza dell'auto-assemblaggio dei dimeri di KP (**Figura 10a**). La forma dimerica è in grado di assemblarsi spontaneamente e reversibilmente a formare una rete organizzata di fibrille simile a un idrogel, grazie alla formazione di legami idrogeno piuttosto che di interazioni idrofobiche, dalla quale successivamente la forma attiva è in grado di essere

rilasciata gradualmente. L'aggregazione strutturale sembra essere reversibile in funzione della diluizione e della temperatura; infatti, valutando una diluizione di una soluzione stock di KP, preparata un mese prima e conservata a 4°C, a diversi tempi dopo la diluizione, si osserva un progressivo cambiamento degli spettri DC indicativo della perdita della struttura secondaria (**Figura10b**). Dopo 6 ore, lo spettro DC mostra che il peptide, ancora in forma attiva, presenta una conformazione *random-coil* [70]. L'aggregazione è fortemente accelerata dalla presenza di laminarina, un β -1,3-glucano solubile, o di cellule di *C. albicans* che espongono β -1,3-glucano sulla parete, poiché il dimero vi si può legare facilmente e dare inizio al processo di auto-aggregazione.

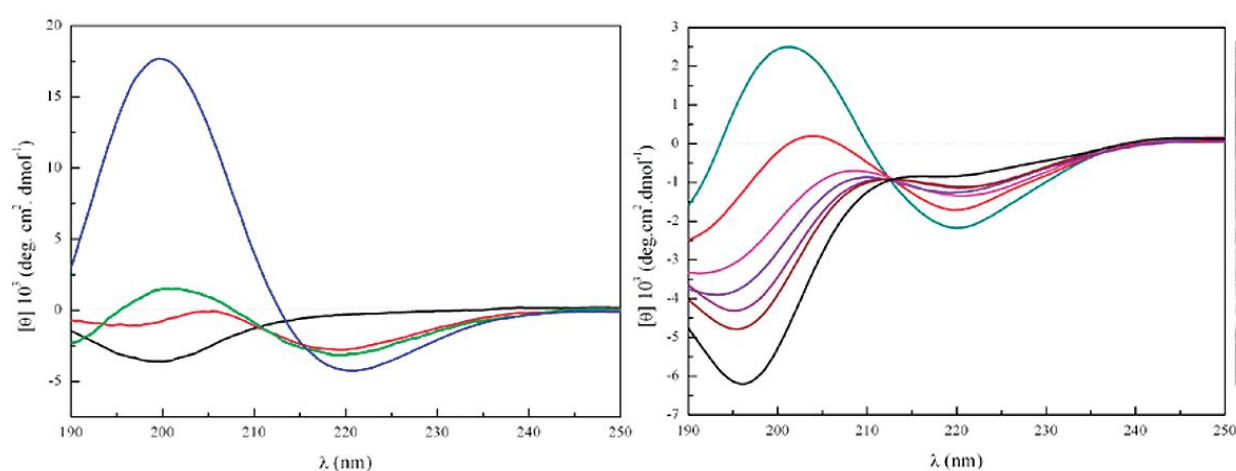


Figura 10. Auto-assemblaggio reversibile di KP. **(a, sinistra)** Spettri DC di soluzioni di KP 100 μ M acquisiti a 20°C utilizzando campioni preparati da una soluzione stock mantenuta a 4°C per 1 ora (linea nera), 3 giorni (linea rossa), 1 mese (linea verde chiaro) e 6 mesi (linea blu). **(b, destra)** Spettri DC di soluzioni di KP 100 μ M, preparate da una soluzione stock mantenuta a 4°C per un mese, in funzione del tempo: 0 min (linea verde scuro), 20 min (linea rossa), 40 min (linea magenta), 60 min (linea viola), 80 min (linea viola scuro), 100 min (linea marrone) e 330 min (linea nera) [70].

L'auto-assemblaggio molecolare è un fenomeno conosciuto da tempo e l'uso di peptidi dotati di questa proprietà è stato proposto per lo sviluppo di materiali biologici e dispositivi medici e per il rilascio controllato di farmaci [71-74]. La capacità di auto-assemblaggio conferisce a KP protezione *in vivo* nei confronti dell'azione di proteasi e può fornire un effetto anticandida terapeutico prolungato nel tempo; questo peptide è stato perciò proposto come modello paradigmatico di una nuova classe di peptidi anti-infettivi autodelivering [70].

Non è stato ancora chiarito se le singole molecole di KP, nella formazione del dimero, si dispongono in modo parallelo o antiparallelo, come mostrato in **Figura 11** [69].

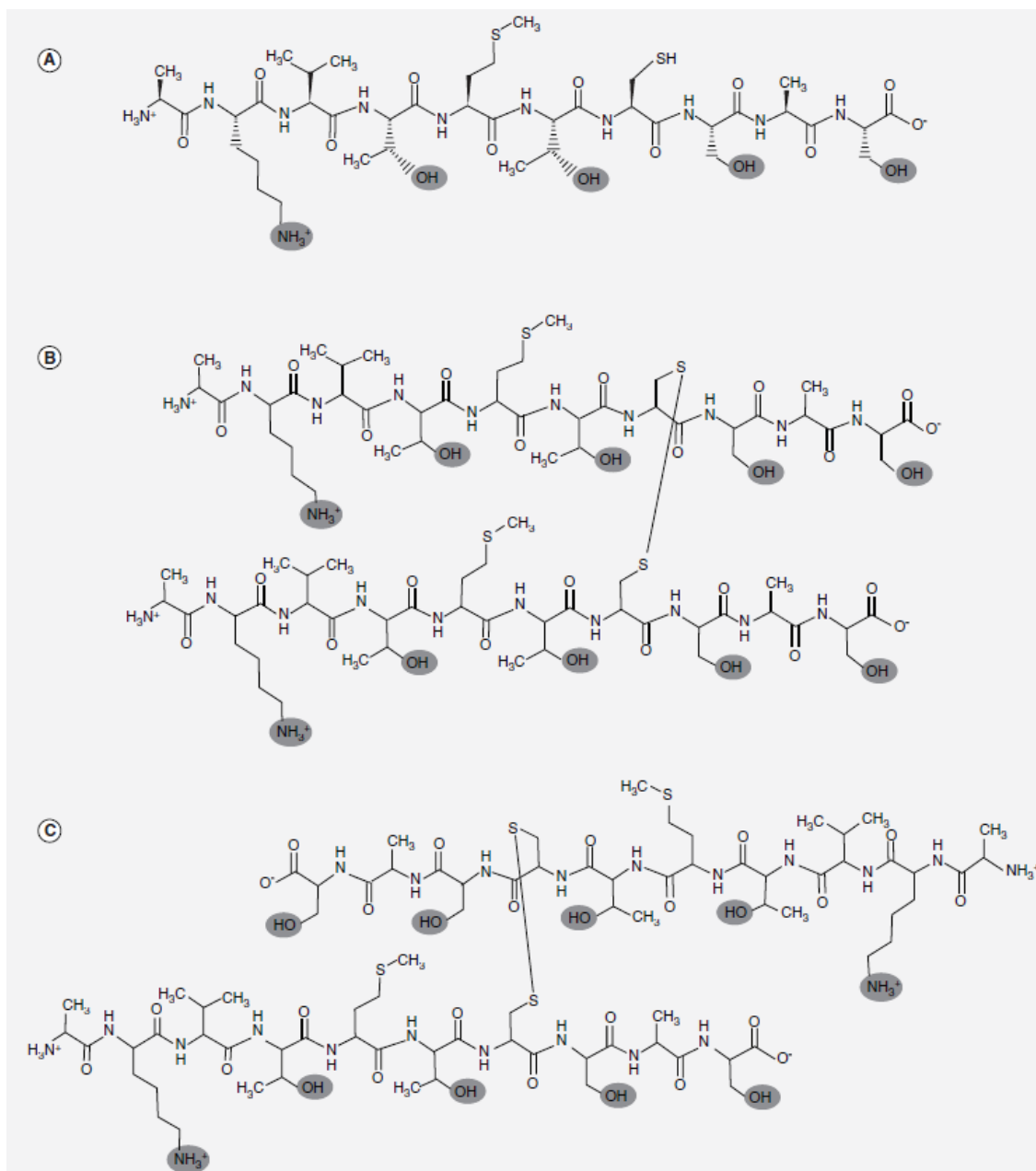


Figura 11. Possibili strutture molecolari di KP. **(A)** Forma monomerica, **(B)** dimero parallelo e **(C)** dimero antiparallelo. Sono evidenziati i gruppi della faccia polare di KP potenzialmente coinvolti nella formazione di una struttura simile a idrogel [69].

Nel meccanismo d'azione di KP, ancora non completamente definito, sembra rilevante l'interazione tra il peptide e β -1,3-D-glucani, presenti nella parete cellulare di lieviti sensibili, che hanno una struttura lineare poco ramificata (**Figura 12**). Il legame di KP a strutture ripiegate, come β -1,6-glucani, comporterebbe la formazione di un numero inferiore di legami idrogeno, e ciò potrebbe spiegare la maggior affinità del peptide per i glucani con legami 1-3.

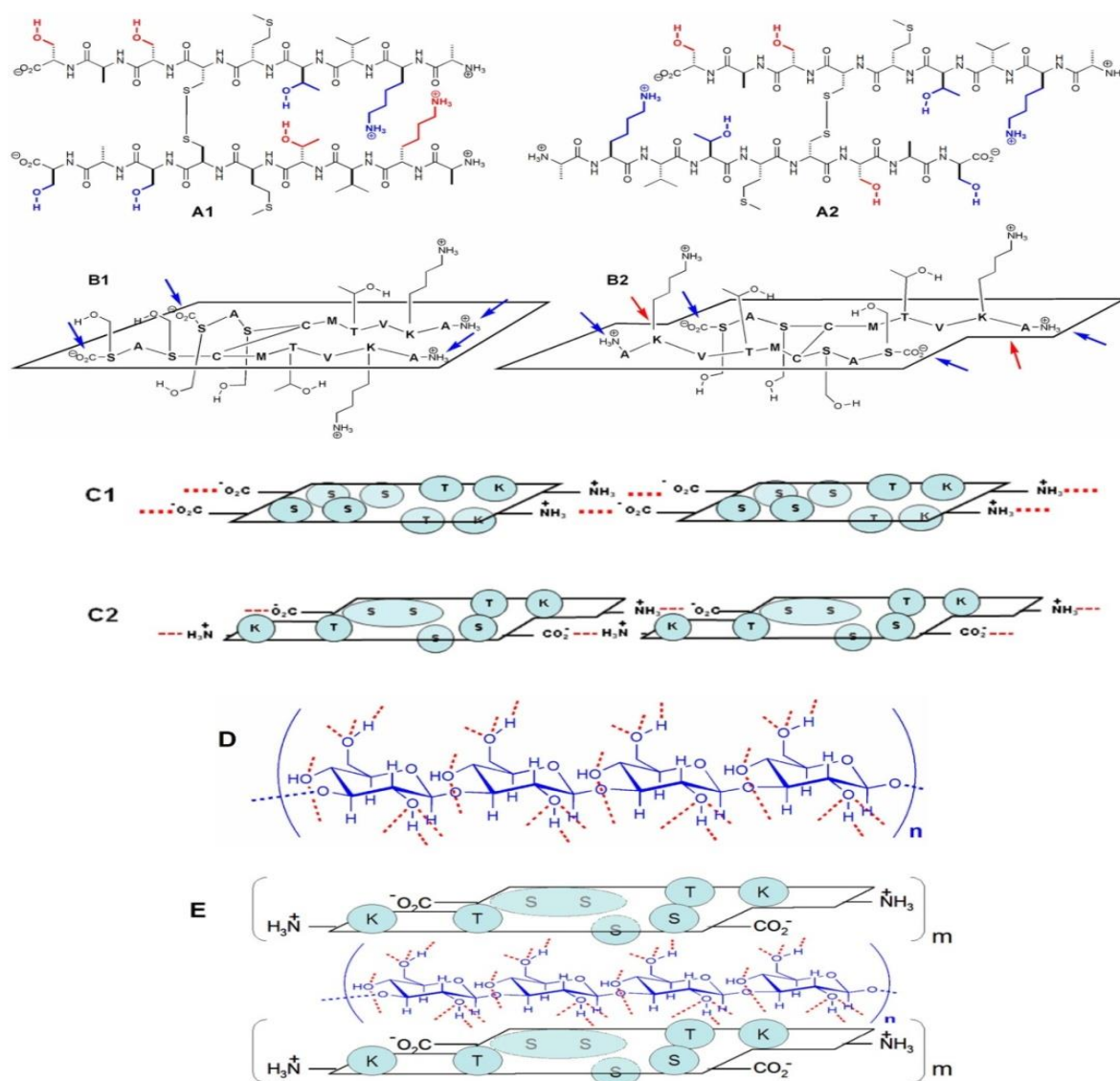


Figura 12. Possibile interazione tra dimeri paralleli e antiparalleli di KP e β -1,3-glucani. (A) Struttura molecolare della conformazione parallela (A1) e antiparallela (A2) del dimero KP. Le catene laterali colorate in rosso e in blu indicano rispettivamente le posizioni dei gruppi sotto e sopra il piano del foglietto β . (B1) Localizzazione spaziale dei gruppi idrofili rispetto al piano del foglietto β per i dimeri di KP paralleli (B1) e antiparalleli (B2). Le frecce blu indicano i gruppi coinvolti nelle interazioni elettrostatiche intermolecolari complementari tra i dimeri di KP, le frecce rosse indicano i punti in cui preferenzialmente si formano i legami idrogeno intermolecolari per formare la struttura bidimensionale. (C) Rappresentazione della struttura bidimensionale dei dimeri di KP paralleli e antiparalleli, in cui gli amminoacidi idrofili delle catene laterali (S, T) sono disponibili per formare legami idrogeno con il β -1,3-D-glucano. Si ipotizza che anche la lisina (K) possa interagire con il β -1,3-glucano. (D) Struttura molecolare di β -1,3-glucano e atomi di idrogeno potenzialmente coinvolti nella formazione di legami con dimeri di KP. (E) Rappresentazione ipotetica della struttura tridimensionale formata dall'interazione di β -1,3-glucano e dimeri di KP antiparalleli, mediante legami idrogeno [75].

Nel meccanismo di azione di KP potrebbero essere coinvolte anche interazioni con altri bersagli, come proteine, ad esempio implicate nella sintesi di β -1,3-D-glucani, o altri polisaccaridi, ad esempio α -1,3-glucani lineari, presenti sulla superficie di alcuni batteri, che possono fornire gruppi OH per la formazione di legami idrogeno con KP.

A partire dalla constatazione che il peptide P6, da cui è originato KP, è presente nella sequenza di altri Ab ricombinanti e non solo nell'Ab antiidiotipico immagine interna di *WaKT*, è stato ipotizzato che altri peptidi di derivazione anticorpale potessero essere dotati di analoghe attività biologiche. Seguendo approcci sperimentali simili è stato in effetti dimostrato che, indipendentemente dalla specificità dell'Ab di origine, peptidi corrispondenti ai CDR, derivati da Ab murini ed umani non correlati tra loro, e anche frammenti derivati dalla porzione costante di Ab umani di diverso isotipo possono esercitare attività antimicrobiche, antivirali ed immunomodulanti [75-79].

In questo scenario gli Ab rappresentano una potenziale fonte illimitata di peptidi che potrebbero essere utilizzati come alternativa o come adiuvanti alle terapie convenzionali, per il trattamento di malattie da infezione analogamente a quanto ipotizzato per AMP naturali [80-83].

Malattie causate da protozoi

I protozoi sono responsabili di gravi malattie nell'uomo e causano ogni anno centinaia di migliaia di morti [84].

Alcune malattie causate da protozoi, come malaria e leishmaniosi, sono endemiche in molti Paesi, fanno registrare un elevato numero di nuovi casi ogni anno e presentano un non trascurabile tasso di mortalità.

L'incidenza di alcune malattie ad eziologia protozoaria, in particolare quelle dovute all'ingestione di alimenti contaminati o di carni infette, come la toxoplasmosi, può essere ridotta con il potenziamento dell'educazione sanitaria e con il miglioramento delle condizioni igieniche, mentre la riduzione dell'incidenza di quelle trasmesse da vettori, come malaria o leishmaniosi, è più difficile da ottenere, in quanto comporta il controllo sia dei vettori sia degli ospiti che fungono da serbatoio, quindi di molteplici fattori, tra cui i cambiamenti climatici, lo spostamento di intere popolazioni e i viaggi.

Attualmente il controllo di queste malattie, per cui non sono disponibili vaccini, si basa su diversi metodi di prevenzione, chemioprophilassi, diagnosi accurate e tempestive e utilizzo di farmaci specifici, che però sono limitati e non sempre privi di effetti avversi [84].

Toxoplasmosi

La toxoplasmosi è una zoonosi ampiamente diffusa in tutto il mondo, che può essere riscontrata in una grande varietà di specie animali, incluso l'uomo [85,86]. L'agente eziologico è *Toxoplasma gondii*, un protozoo parassita intracellulare obbligato appartenente al *Phylum Apicomplexa*, sottoclasse *Coccidia*, che si stima infettare circa un terzo della popolazione mondiale [86,87].

La prima descrizione del parassita risale al 1908, quando la forma asessuata fu ritrovata in Tunisia in tessuti di un piccolo roditore (*Ctenodoactylus gundi*) da Nicolle e Manceaux e in Brasile in tessuti di un coniglio da Splendore [88,89]. Furono proprio Nicolle e Manceaux a denominarlo "Toxoplasma" per la sua forma ad arco (dal greco: "toxos", "curva" o "arco"; "plasma", "essere" o "creatura"). Sono state poi ritrovate altre forme del parassita, tra cui le cisti tissutali, ma solo tra il 1960 e 1970 fu riconosciuto come un coccidio. Il gatto fu identificato come ospite definitivo da diversi gruppi di ricercatori, tra cui Dubey e Frenkel nel 1970 [90,91].

Il ciclo biologico del parassita comprende una fase di riproduzione sessuata, che si svolge nelle cellule intestinali dell'ospite definitivo, il gatto, e che porta alla formazione di oocisti, e una fase asessuata, che si svolge anche in ospiti intermedi e porta alla formazione di tachizoiti, forme parassitarie a rapida replicazione, in grado di lisare le cellule infettate e invadere altri tessuti, e di bradizoiti, forme a lenta replicazione localizzate in cisti tissutali [85,86,92].

Il ciclo vitale (**Figura 13**) in natura si alterna tipicamente tra un ospite definitivo felino e un ospite intermedio, come roditori, uccelli o suini. Il gatto si infetta quando ingerisce cisti tissutali contenenti bradizoiti. Per azione degli enzimi gastrici sono liberati i bradizoiti, che vanno a localizzarsi a livello delle cellule intestinali, nelle quali vanno incontro a un numero limitato di divisioni asessuate (tachizoiti). A seguito di stimoli ancora poco definiti, ma legati presumibilmente alla risposta di difesa del felino, alcuni tachizoiti si differenziano in gameti femminili e maschili. A seguito della fecondazione si formano le oocisti immature, che vengono rilasciate nell'ambiente con le feci e, entro due o tre giorni, a seconda delle condizioni ambientali (umidità e temperatura), divengono infettanti (sporulazione), dando origine a sporocisti, contenenti gli sporozoiti infettanti.

La principale via di infezione per altri mammiferi è rappresentata dal consumo di alimenti e acqua contaminati da queste oocisti, sebbene un'altra frequente fonte di infezione sia il consumo di carne cruda o poco cotta in cui sono presenti bradizoiti in cisti tissutali.

ne promuove la conversione a bradizoiti in cisti tissutali (fase cronica), che si localizzano a livello del tessuto muscolare o del sistema nervoso centrale e possono rimanere quiescenti per l'intera vita dell'ospite, ma, in presenza di un sistema immunitario compromesso, possono riattivarsi, con riconversione a tachizoiti [84]. In individui immunocompetenti, quindi, l'infezione decorre solitamente in forma asintomatica, ma gravi manifestazioni cliniche possono presentarsi nel paziente immunodepresso e quando l'infezione è trasmessa dalla madre al feto durante la gravidanza. In individui immunocompromessi, soprattutto soggetti affetti da AIDS, si verifica frequentemente la riattivazione di infezioni latenti, mentre in donne in stato di gravidanza l'infezione primaria può determinare il passaggio transplacentare dei tachizoiti e quindi una infezione congenita, la cui gravità dipende dallo stadio della gestazione in cui avviene il contatto materno con il parassita [85,87,93].

Attualmente il trattamento della toxoplasmosi si basa sulla somministrazione di una combinazione di farmaci, principalmente pirimetamina e sulfadiazina, che agiscono contro i tachizoiti ma non eliminano le forme incistate [94,95]. Questi farmaci presentano tuttavia alcune problematiche, tra cui elevata tossicità e limitata riduzione del rischio di trasmissione transplacentare dell'infezione [96,97], che rendono auspicabile lo sviluppo di altri possibili agenti anti-*Toxoplasma*.

Malaria

Protozoi del genere *Plasmodium* sono gli agenti eziologici della malaria, una malattia da infezione di rilevante interesse a livello mondiale: come riportato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel 2015 sono stati stimati 212 milioni di casi, con 429.000 morti [98]. L'infezione umana è causata principalmente da quattro specie (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax*), tra le quali *P. falciparum* è responsabile del maggior numero di decessi, ma, occasionalmente, l'uomo può essere infettato anche da specie che normalmente infettano le scimmie, come *P. knowlesi*, attualmente riconosciuto come responsabile di casi di malaria umana nel Sud-Est asiatico.

La trasmissione del plasmodio all'uomo dipende principalmente da insetti vettori del genere *Anopheles*, le cui femmine iniettano il parassita durante il pasto ematico [99].

Il ciclo vitale di tutte le specie di plasmodi che infettano l'uomo è caratterizzato da una fase sessuata esogena (sporogonia), che avviene nella zanzara, e una fase asessuata endogena (schizogonia), che avviene nell'ospite vertebrato. A seguito della puntura dell'insetto vettore, il parassita viene inoculato nel torrente circolatorio sotto forma di sporozoiti (circa un centinaio) che, nell'arco di un'ora, invadono gli epatociti, all'interno dei quali si differenziano

in schizonti (ciclo schizogonico epatico o pre-eritrocitario). Queste sono le forme di moltiplicazione asessuata, che, alla maturazione, causano la rottura delle cellule e liberano merozoiti (ciclo epatico). Infine i merozoiti raggiungono il circolo sanguigno e infettano gli eritrociti, in cui avviene il ciclo schizogonico eritrocitario: il parassita si differenzia attraverso vari stadi di maturazione (trofozoiti e schizonti). Alla maturazione gli schizonti portano alla rottura del globulo parassitato, determinando il rilascio di altri merozoiti, che invadono a loro volta altri eritrociti, dando inizio a un nuovo ciclo (ciclo intraeritrocitario). La fase di sviluppo intraeritrocitario è causa delle manifestazioni cliniche di malattia, tra cui i caratteristici picchi di febbre, epato-splenomegalia e possibile anemia. La maggior parte dei casi fatali, che riguarda in particolare bambini sotto ai cinque anni e donne in stato di gravidanza ed è causata da *P. falciparum*, è dovuta a grave anemia e malaria cerebrale, ma possono presentarsi sintomi clinici di varia entità a seconda della specie di parassita, organo coinvolto e disponibilità di cure [100,101].

Alcuni merozoiti possono differenziarsi nella forme sessuate del parassita: gametocita maschile (microgametocita) e gametocita femminile (macrogametocita), in grado di infettare una zanzara vettore che compie il pasto ematico sul soggetto infetto. I gametociti della specie *falciparum* maturano attraverso cinque stadi morfologicamente differenti nell'arco di 10-12 giorni. Al primo stadio il gametocita è pressoché indistinguibile dal trofozoita asessuato e inizia a distinguersi nello stadio II assumendo una forma a falce più allungata (da cui deriva il nome *falciparum*). Allo stadio III il parassita si allunga ulteriormente e le estremità si arrotondano, mentre al IV risultano appuntite. All'ultimo stadio i gametociti sono rilevabili nel torrente circolatorio e sono sessualmente distinguibili, infatti quelli femminili sono più lunghi e arrotondati. A livello dello stomaco della zanzara, i gametociti maturi diventano gameti e si fondono dando origine allo zigote. Questo matura in oocinete che penetra attraverso la parete dello stomaco e si differenzia in oocisti sferica, il cui nucleo si divide più volte generando sporozoiti, in grado di risalire fino alle ghiandole salivari dell'insetto (ciclo sporogonico). La puntura di un artropode vettore in cui è presente il parassita a questo stadio del ciclo può determinare l'infezione nell'ospite vertebrato [100]. In **Figura 14** è rappresentato schematicamente il ciclo vitale del plasmodio.

La diffusione degli insetti vettori e della malattia è influenzata da cambiamenti climatici, fenomeni di migrazione, condizioni economiche e sanitarie della popolazione. Nonostante siano disponibili diversi farmaci per la cura e la profilassi della malaria, sono ancora molti i casi di malattia e morte, soprattutto nei paesi endemici tropicali e sub-tropicali. Attualmente esistono diverse molecole attive nei confronti delle forme asessuate (schizonticidi), ed alcune

attive anche nei confronti delle forme sessuate (gametociti). Nei confronti di alcuni tra i farmaci più utilizzati, come cloroquina e derivati dell'artemisinina, è stato riscontrato lo sviluppo di resistenze da parte dei protozoi [102]. Risulta perciò importante ricercare nuove molecole attive contro tutte le forme del ciclo vitale dei plasmodi, per superare la farmacoresistenza e prevenire la trasmissione del parassita.

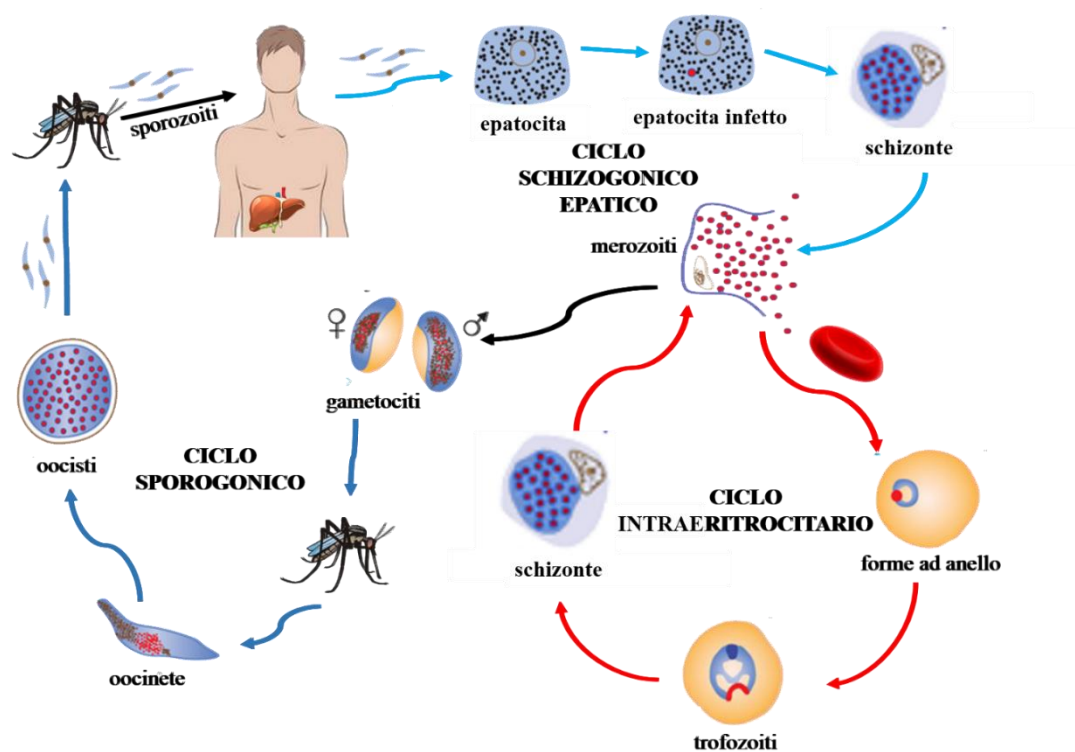


Figura 14. Ciclo vitale di *P. falciparum*. Il parassita viene inoculato sotto forma di sporozoiti nell'uomo durante il pasto ematico di una zanzara infetta. Gli sporozoiti colonizzano gli epatociti, all'interno dei quali vanno incontro a riproduzione asessuata con formazione dello schizonte, da cui originano numerosi merozoiti. Infine i merozoiti entrano nella fase schizogonica eritrocitaria, differenziandosi in trofozoiti e schizonte, da cui si originano altri merozoiti. Alcuni di essi si differenziano nelle forme sessuate (macrogametocita femminile e microgametocita maschile). Durante il pasto ematico su un uomo infetto la zanzara assume i gametociti che, all'interno dello stomaco dell'insetto, portano alla formazione dello zigote che evolve in oocinete e oocisti, la quale può rilasciare numerosi sporozoiti. Gli sporozoiti successivamente risalgono alle ghiandole salivari della zanzara e possono quindi essere iniettati nel circolo ematico di un nuovo ospite.

Leishmaniosi

La leishmaniosi è una zoonosi causata da protozoi intracellulari appartenenti a numerose specie del genere *Leishmania*. Le specie *tropica*, *major*, *donovani*, *infantum* e *braziliensis*

sono quelle principalmente responsabili delle tre forme di malattia dell'uomo: leishmaniosi cutanea, viscerale e mucocutanea [103]. La trasmissione del parassita è dovuta a insetti vettori ematofagi del genere *Phlebotomus*, presente in Europa, Asia e Africa, e del genere *Lutzomyia*, diffuso in America [104]. Attualmente la malattia è presente in 89 Paesi e risulta endemica in Africa, Asia, America e nelle regioni Mediterranee. I nuovi casi all'anno sono più di un milione, di cui decine di migliaia con decorso infausto [105].

La principale via di acquisizione dell'infezione umana è rappresentata dalla puntura di un flebotomo infetto, ma sono stati documentati rari casi in cui l'infezione è avvenuta tramite l'utilizzo di aghi contaminati, trasfusioni di sangue, trapianto di organi e trasmissione verticale [84].

Il ciclo vitale del parassita comprende due diversi stadi: una forma extracellulare flagellata (promastigote) che matura nell'insetto vettore, e una forma intracellulare (amastigote) presente nell'ospite mammifero (uomo, cane, gatto e roditori). I promastigoti vengono inoculati nel derma dell'ospite durante il pasto ematico del flebotomo vettore infetto. Essi vengono rapidamente fagocitati dai macrofagi, all'interno dei quali perdono il flagello trasformandosi in amastigoti, che si moltiplicano per scissione binaria determinando la rottura della cellula, con conseguente rilascio di parassiti in grado di infettare altre cellule. Se un flebotomo compie il pasto ematico su un individuo infetto può assumere i macrofagi contenenti gli amastigoti, i quali vengono liberati nell'intestino dell'insetto, maturano in promastigoti, si moltiplicano e danno origine a promastigoti metaciclici infettanti, che migrano alla proboscide rendendo l'insetto stesso potenzialmente infettante per l'ospite vertebrato in seguito ad un successivo pasto ematico [103]. Il ciclo vitale è mostrato schematicamente in **Figura 15**.

La prevalenza della malattia è associata a diversi fattori, sia di tipo socio-economico, come povertà, malnutrizione e mancanza di adeguate risorse economiche per poter monitorare malattia e pazienti, sia ambientali, quali cambiamenti climatici, deforestazione e urbanizzazione [105,106].

La gravità delle manifestazioni cliniche della leishmaniosi dipende dalla patogenicità della specie infettante e dalla risposta immune dell'ospite, per questo motivo i soggetti più a rischio sono rappresentati da pazienti immunocompromessi e bambini [104].

Attualmente, il trattamento della leishmaniosi si basa sulla somministrazione di farmaci come l'antimonio pentavalente, l'amfotericina B e la miltefosina, che tuttavia presentano problematiche di tossicità, costo e prolungati tempi di somministrazione. Tali aspetti, uniti alla progressiva insorgenza di fenomeni di resistenza da parte del parassita relativamente ai

composti antimoniali [103,107], spingono alla ricerca di nuove molecole attive nei confronti del protozoo, per la terapia e l'inibizione della trasmissione dell'infezione.

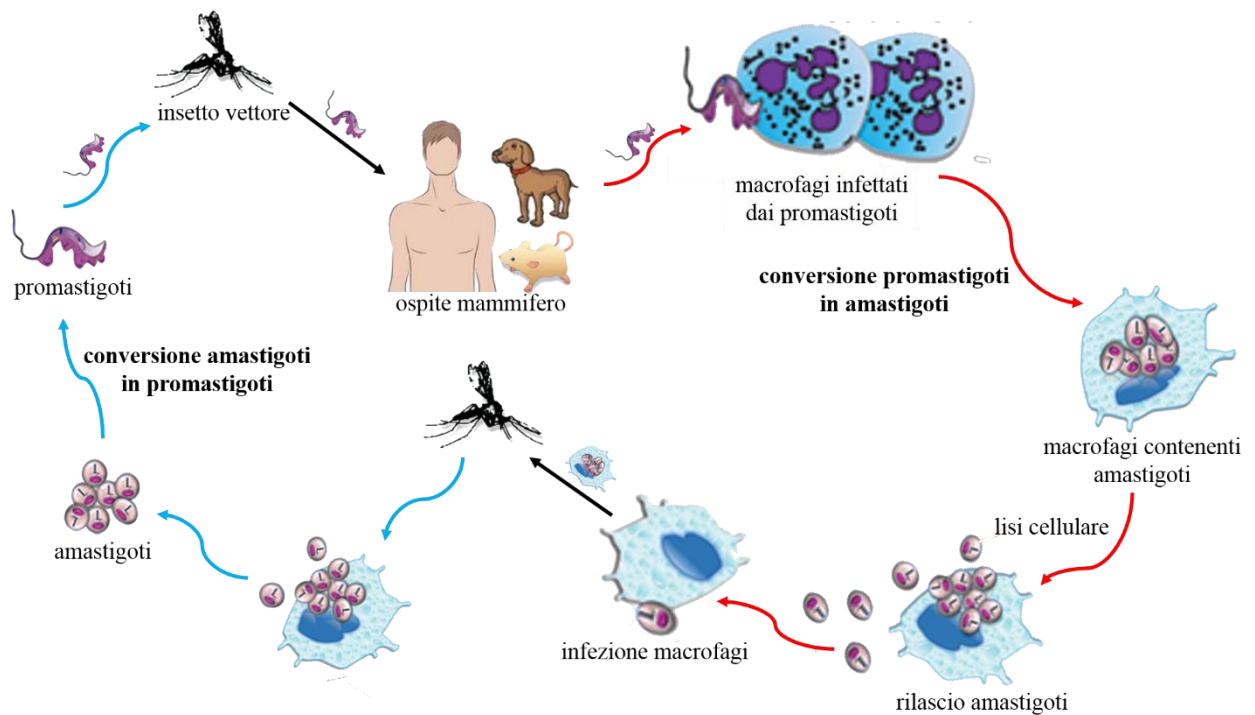


Figura 15. Ciclo vitale di *Leishmania*. Il parassita viene trasmesso all'ospite mammifero dalla puntura della femmina di un flebotomo, che inietta la forma extracellulare (promastigote) nel circolo ematico. I promastigoti vengono fagocitati dai macrofagi, all'interno dei quali si convertono nella forma intracellulare (amastigote), in grado di moltiplicarsi e infettare altre cellule (manifestazione della malattia). Se un flebotomo compie il pasto ematico su un ospite infetto, ingerisce i macrofagi contenenti gli amastigoti, che, liberati nell'intestino, maturano in promastigoti, in grado di moltiplicarsi e migrare alla proboscide del flebotomo.

SCOPO DELLA RICERCA

Oggetto del progetto, nell'ambito del Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare, XXX ciclo, è stato la valutazione dell'attività di peptidi di derivazione anticorpale nei confronti di protozoi di interesse medico, al fine di individuare nuove molecole per un potenziale uso terapeutico.

I microrganismi utilizzati nello studio sono *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania infantum* e *L. tropica*, agenti eziologici di malattie di grande interesse a livello mondiale.

È stata indagata l'attività di KP, un decapeptide sintetico le cui proprietà antimicrobiche, nei confronti di microrganismi (funghi, batteri, alcuni protozoi), ed anche virus erano già state ampiamente dimostrate in precedenza, e dei peptidi K10S, K10S-I, K10S-SS, K10T-TT e R10S-RR, da esso derivati.

L'attività di KP è stata saggiata nei confronti di tutti i protozoi oggetto dello studio.

In particolare, dopo aver constatato l'assenza di tossicità da parte del peptide in cellule Vero utilizzate per l'infezione con *Toxoplasma*, è stata valutata l'eventuale riduzione dell'indice di infezione e della proliferazione intracellulare di tachizoiti extracellulari.

Essendo risultati significativamente ridotti entrambi gli indici, è stato indagato il possibile meccanismo d'azione del peptide eseguendo saggi per la determinazione dell'esternalizzazione di fosfatidilserina, della frammentazione del DNA genomico e della variazione del potenziale mitocondriale dopo trattamento con KP.

Parallelamente, KP e i cinque peptidi da esso derivati sono stati saggiati nei confronti di forme asessuate e sessuate (gametociti) di *P. falciparum* mediante, rispettivamente, saggio della lattato deidrogenasi e della luciferasi; di forme extracellulari (promastigoti) e intracellulari (amastigoti) di *L. infantum* e di promastigoti di *L. tropica*, mediante, rispettivamente, saggi colorimetrici e microscopia ottica.

MATERIALI E METODI

Peptidi

Il peptide KP e il peptide *scrambled* SP, costituito dagli stessi dieci amminoacidi di KP disposti in sequenza diversa e utilizzato come controllo in alcuni saggi, sono stati sintetizzati da NeoMPS (PolyPeptide Group, Strasburgo, Francia).

Sono stati inoltre utilizzati, per la valutazione dell'attività nei confronti di *P. falciparum* e *Leishmania* spp., altri cinque peptidi derivati da KP, ottenuti per sintesi chimica allo stato solido utilizzando il 9-fluorenil metilossicarbonile (Fmoc), tramite un sintetizzatore di peptidi "Syro II" (MultiSynTech, Germania), presso il Centro di Ricerca Interdipartimentale per le Biotecnologie Innovative (CRIBI) dell'Università degli Studi di Padova. I peptidi sono stati purificati in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) utilizzando una colonna a fase inversa C18 e la massa molecolare è stata confermata mediante spettrometro di massa "MALDI TOF-TOF" (modello 4800 - Applied Biosystems).

I peptidi liofilizzati sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione di 20 mg/ml, conservati a 4°C e diluiti al momento dell'utilizzo alla concentrazione desiderata.

La sequenza e la massa molecolare dei sette peptidi utilizzati sono riportate in **Tabella 1**. In particolare, il peptide K10S è caratterizzato da una sostituzione del residuo di alanina, primo amminoacido della sequenza di KP, con un residuo di lisina, mentre gli altri peptidi sono stati variamente modificati per sostituzione di uno o due amminoacidi sempre a partire dalla sequenza di K10S.

Tabella 1. Sequenza e massa molecolare dei peptidi investigati

Peptide	Sequenza	MM (dalton)
KP	AKVTMTCSAS	998,17
SP	MSTAVSKCAT	998,17
K10S	KKVTMTCSAS	1055,27
K10S-I	KKVTMTCSIS	1097,34
K10S-SS	KKVSMSCSAS	1026,47
K10T-TT	KKVTMTCTAT	1082,54
R10S-RR	RRVTMTCSAS	1110,52

Valutazione dell'attività di KP nei confronti di tachizoiti extracellulari di *Toxoplasma gondii*

In collaborazione con il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Parma è stata indagata l'attività *in vitro* di KP nei confronti di tachizoiti extracellulari di *T. gondii*.

Saggio di tossicità di KP nei confronti di cellule Vero

La citotossicità del peptide KP nei confronti di fibroblasti di rene di scimmia (cellule Vero, ECACC 84113001) è stata valutata mediante saggio colorimetrico con bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). MTT è un colorante giallo che può essere ridotto a cristalli di formazano di colore blu-violaceo dall'enzima succinato deidrogenasi, attivo solo nei mitocondri di cellule vitali.

Cellule Vero, coltivate in RPMI 1640, contenente L-glutamina 2 mM, penicillina 100 U/ml e streptomycin 0,1 mg/ml (terreno completo), con l'aggiunta del 10% di siero bovino fetale (FBS), sono state seminate in una piastra per colture cellulari da 96 pozzetti a fondo piatto alla concentrazione finale di 1×10^5 cellule/ml (100 µl/pozzetto). La piastra è stata incubata a 37°C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Dopo 24 ore, il surnatante è stato rimosso e le cellule sono state trattate per 24 ore con KP alla concentrazione finale di 50, 100, 200 e 400 µg/ml, in RPMI 1640 con l'aggiunta del 2% di FBS. Come bianco è stato utilizzato il terreno di coltura e come controllo positivo cellule coltivate in terreno in assenza di peptide.

Dopo aver eliminato il surnatante, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di terreno senza siero contenente MTT alla concentrazione finale di 5 mg/ml e la piastra è stata reincubata per 2 ore a 37°C. I cristalli di formazano formati a causa della riduzione di MTT da parte delle cellule vitali sono stati solubilizzati con 100 µl/pozzetto di isopropanolo acidificato al 5% con HCl 1M. L'assorbanza è stata misurata a 540 nm con un lettore spettrofotometrico per micropiastre.

Ogni concentrazione di peptide è stata saggiata in triplo in due esperimenti indipendenti, a scopo statistico. I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule vitali in comparazione al controllo in assenza di peptide.

Effetto di KP sull'invasione e sulla proliferazione intracellulare di *T. gondii* in cellule Vero

Tachizoiti del ceppo RH, Tipo I, sono stati mantenuti mediante passaggi continui in cellule Vero coltivate in fiasche da 75 cm² in terreno RPMI 1640 completo addizionato con 10%

FBS, incubate a 37°C, in atmosfera al 5% di CO₂. I tachizoiti sono stati raccolti dalle colture subito prima dell'uso.

Cellule Vero sono state seminate in piastre per colture su vetrino da 8 pozzetti (1,5×10⁴ cellule per pozzetto) e coltivate in 500 µl di RPMI 1640 supplementato con il 10% di FBS. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂, le cellule sono state infettate con tachizoiti di *T. gondii*, in rapporto di 5 parassiti per cellula.

Al momento dell'infezione in alcuni pozzetti è stato aggiunto KP (concentrazione finale 25, 50, 100 e 200 µg/ml) o SP alla concentrazione di 200 µg/ml. Come controllo sono state utilizzate cellule infettate in assenza di peptide. Dopo 72 ore di incubazione le cellule sono state lavate con tampone fosfato (PBS) e fissate in formalina al 10% per 24 ore. Dopo la rimozione dai pozzetti, i vetrini sono stati colorati con la colorazione di Giemsa modificata (Diff-Quick Stain, Bio-Optica), montati e osservati al microscopio ottico (40×). Almeno tre vetrini per ciascuna condizione di saggio sono stati allestiti e osservati da due diversi operatori.

E' stato determinato l'indice di infezione, cioè il numero di cellule infettate su 200 cellule esaminate, e la proliferazione intracellulare, cioè il numero di tachizoiti presenti all'interno di 200 cellule esaminate. I risultati sono stati espressi come valori medi (± deviazione standard) e come percentuali di inibizione, in comparazione al controllo in assenza di KP, calcolate secondo le seguenti formule:

$$\% \text{ di inibizione indice infezione} = 100 - \frac{\text{N}^\circ \text{ di cellule infette in presenza di peptide}}{\text{N}^\circ \text{ di cellule infette in assenza di peptide}} \times 100$$

$$\% \text{ di inibizione proliferazione intracellulare} = 100 - \frac{\text{N}^\circ \text{ di tachizoiti in presenza di peptide}}{\text{N}^\circ \text{ di tachizoiti in assenza di peptide}} \times 100$$

Valutazione dell'effetto di KP mediante rilevamento del DNA parassitario

Cellule Vero sono state seminate in piastre per colture cellulari da 12 pozzetti (1×10⁵ cellule per pozzetto) e, dopo incubazione a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ per 24 ore in 500 µl di RPMI 1640 supplementato con il 10% di FBS, il monostrato confluyente è stato infettato con tachizoiti di *T. gondii* in rapporto di 5 parassiti per cellula.

Al momento dell'infezione, in alcuni pozzetti è stato aggiunto KP (concentrazione finale 50, 100 e 200 µg/ml) o SP alla concentrazione di 200 µg/ml. Come controllo sono state utilizzate

cellule infettate in assenza di peptide.

Dopo 3 ore dall'infezione il terreno è stato sostituito con RPMI 1640 fresco supplementato con il 2% di FBS.

Dopo 3, 24, 48 o 72 ore dall'infezione, le colture di cellule Vero infettate sono state osservate al microscopio, quindi i tachizoiti presenti nel surnatante di ogni pozzetto sono stati raccolti in provette da 15 ml, insieme alla soluzione tampone di Hank utilizzata successivamente per lavare due volte il monostrato cellulare.

Le cellule, trattate con tripsina/acido etilendiamminotetracetico (EDTA) a 37°C per qualche minuto per permetterne il distacco dalla piastra, sono state unite ai tachizoiti precedentemente raccolti e le provette sono state centrifugate a 1800 *g* per 10 minuti. Il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato risospeso in PBS.

Il DNA parassitario è stato estratto tramite il kit “DNeasy Blood & Tissue” (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore, e quantificato spettrofotometricamente.

Tutti i campioni di DNA sono stati utilizzati come *template* per la reazione polimerasica a catena quantitativa in tempo reale (real-time qPCR) determinando la quantità di DNA parassitario tramite il kit “SsoAdvanced SYBR Green Supermix” (Bio-Rad) e lo strumento CFX96 (Bio-Rad), utilizzando come *primers* le sequenze 5'-CACAGAAGGGACAGAAGT-3' e 5'-TCGCCTTCATCTACAGTC-3' che amplificano una piccola regione di 94 paia di basi all'interno di un frammento di 529 paia di basi bp ripetuto 200-300 volte nel genoma del parassita [108,109]. L'amplificazione ha previsto una fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti e 45 cicli ripetuti a 95°C per 15 secondi e a 58,5°C per 30 secondi. I segnali di fluorescenza sono stati raccolti ad ogni ciclo e la presenza di prodotti aspecifici è stata evitata attraverso l'analisi delle curve di melting.

Per determinare il numero di copie delle sequenze è stata costruita una curva standard utilizzando diluizioni successive 1:10 di un campione a concentrazione nota (intervallo di rilevamento 1,6 ng - 1,6 pg). Servendosi della sequenza registrata nel database NCBI (accession number: AF146527) e di un software disponibile in rete (<http://www.bioinformatics.org/>) è stato determinato il peso molecolare del frammento amplificato, calcolandone quindi il numero di copie per ng di DNA.

Il DNA estratto dopo 3 ore di incubazione è stato considerato come condizione iniziale (tempo zero, t_0) utilizzata per standardizzare i risultati. In tutti gli esperimenti la quantificazione del parassita è stata espressa come DNA vs t_0 .

Ciascun saggio è stato eseguito in triplo in due esperimenti indipendenti.

L'analisi statistica è stata condotta con il programma GraphPad. I dati sono stati riportati

come valori medi $\pm$ deviazione standard (SD) e sono stati valutati mediante analisi della varianza (ANOVA) a una via utilizzando il test *post hoc* di Tukey.

Saggio di esternalizzazione della fosfatidilserina come indicatore di apoptosi in tachizoiti di *T. gondii*

La valutazione dell'eventuale induzione di apoptosi in tachizoiti di *T. gondii* in seguito a trattamento con KP è stata effettuata mediante il citofluorimetro Muse Cell Analyzer (Merck Millipore) utilizzando il kit "Muse Annexin V & Dead Cell Assay" (Merck Millipore).

Il kit utilizzato è composto da Annessina V, una proteina con elevata affinità per la fosfatidilserina, un fosfolipide solitamente esposto nella parte interna della membrana citoplasmatica, che trasloca sulla superficie esterna della membrana in cellule che si trovano in fase di apoptosi precoce, e da 7-ammino-actinomicina D (7-AAD), un marcatore di morte cellulare in grado di intercalarsi nella doppia elica di DNA di cellule in apoptosi tardiva o morenti. La doppia marcatura rende possibile valutare la presenza di processi apoptotici e l'integrità strutturale della membrana cellulare.

Tachizoiti di *T. gondii*, coltivati in cellule Vero, sono stati lavati due volte in PBS mediante centrifugazione a 1800 *g* per 15 minuti, a 4°C, e risospesi in provette per microcentrifuga in RPMI 1640 con il 2% di FBS a una concentrazione finale pari a 1×10^7 tachizoiti/ml. La sospensione è stata incubata in presenza di KP alla concentrazione finale di 50 e 100 µg/ml, a 37°C, in atmosfera al 5% di CO₂. Tachizoiti in assenza di peptide sono stati utilizzati come controllo.

Dopo 3, 24 e 48 ore, 10 µl di sospensione sono stati diluiti in 90 µl di RPMI 1640 con il 10% di FBS, incubando quindi a temperatura ambiente, al buio, 10 µl della diluizione con 90 µl di RPMI 1640 e 100 µl di reagente "Muse Annexin V & Dead Cell Assay".

Dopo 20 minuti sono stati acquisiti i dati al citofluorimetro, determinando le percentuali di cellule in apoptosi precoce (Annessina V positive e 7-AAD negative) e tardiva (Annessina V positive e 7-AAD positive).

Ciascun saggio è stato eseguito tre volte a scopo statistico.

Saggio TUNEL per lo studio della frammentazione del DNA in tachizoiti di *T. gondii*

Al fine di confermare l'induzione di apoptosi in tachizoiti di *T. gondii* in seguito a trattamento con KP, sono stati eseguiti studi in citofluorimetria a flusso, in collaborazione con la Dott.ssa Claudia Fumarola del Laboratorio di Oncologia Sperimentale, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Parma.

I saggi sono stati condotti utilizzando la metodica TUNEL mediante “*In Situ Cell Death Detection kit, TMR red*” (Roche).

Lo scopo di tale metodica è di evidenziare le rotture delle catene di DNA che si verificano durante il processo apoptotico, mediante l'utilizzo dell'enzima Deossinucleotidil Transferasi Terminale (DTT) che catalizza il legame tra le estremità 3'-OH libere del DNA frammentato e i nucleotidi marcati con il fluorocromo tetrametil-rodamina (TMR), evidenziando un segnale fluorescente di intensità direttamente proporzionale al numero di frammenti.

Tachizoiti di *T. gondii*, preparati come precedentemente descritto, sono stati risospesi alla concentrazione finale di 4×10^7 tachizoiti/ml.

KP, alla concentrazione finale di 50 e 100 µg/ml, è stato addizionato all'inoculo di tachizoiti in un volume finale di 320 µl, in provette per microcentrifuga, e le sospensioni sono state incubate a 37°C, in atmosfera umida al 5% di CO₂.

Come controllo è stata utilizzata una sospensione di tachizoiti in assenza di peptide.

Dopo 3, 24 e 48 ore di incubazione, 100 µl di ciascuna sospensione sono stati addizionati con paraformaldeide al 2% in PBS, a pH 7.4, in un volume finale di 200 µl, e le provette sono state incubate a 20°C, in agitazione (120 rpm). Dopo 1 ora i campioni sono stati centrifugati a 1800 g per 10 minuti, a 4°C, e i tachizoiti sono stati risospesi in pozzetti di una piastra da 96, in 100 µl di soluzione permeabilizzante (0,1% Triton X-100 in 0,1% sodio citrato, preparata al momento) per 2 minuti, in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 1800 g per 10 minuti, a 4°C, e un ulteriore lavaggio in PBS, ai campioni sono stati aggiunti 50 µl di miscela di reazione TUNEL contenente DTT e dUTP coniugati a TMR e le sospensioni sono state incubate a 37°C, in atmosfera umidificata, al buio.

Trascorsa 1 ora i campioni sono stati lavati una volta in PBS, risospesi in 100 µl di PBS, quindi diluiti in rapporto 1:10 in PBS a pH 7.4 in un volume finale di 1 ml.

L'identificazione e la quantificazione dei siti di DNA danneggiati marcati con il colorante sono state eseguite tramite citofluorimetria a flusso in un citofluorimetro Beckman Coulter (Brea, CA, USA). Per ciascun campione sono state contate un totale di 10000 cellule.

Sono stati eseguiti due saggi indipendenti e l'analisi statistica è stata effettuata mediante test *t* di Student.

Microscopia confocale a scansione laser per la determinazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) in tachizoiti di *T. gondii*

Lo studio in microscopia confocale a scansione laser di tachizoiti di *T. gondii* trattati con il peptide KP sono stati svolti in collaborazione con la Dott.ssa Silvana Belletti del Laboratorio

di Istologia ed Embriologia, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Parma.

Per il saggio è stata utilizzata la tetrametil-rodamina metil estere (TMRM), una sonda cationica in grado di accumularsi in maniera specifica nei mitocondri attivi di cellule vitali, in base al loro potenziale di membrana ($\Delta\Psi_m$), permettendo un'analisi quantitativa delle variazioni di $\Delta\Psi_m$ attraverso la misurazione dell'intensità di fluorescenza. TMRM infatti, eccitata a una lunghezza d'onda di 543 nm, emette fluorescenza a 560 nm.

Al fine di valutare l'effettivo legame di TMRM ai tachizoiti di *T. gondii*, è stato condotto un saggio preliminare utilizzando il disaccoppiante mitocondriale: carbonil cianuro-4-(trifluorometossi)fenilidrazone (FCCP, Invitrogen, Molecular Probes).

In seguito, tachizoiti di *T. gondii*, preparati come precedentemente descritto, sono stati risospesi alla concentrazione finale di 5×10^7 tachizoiti/ml in RPMI 1640 supplementato con il 2% di FBS e incubati per 18 ore in assenza (controllo) o in presenza di KP alla concentrazione finale di 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ (saggio *end-point*).

Dopo l'incubazione, a 50 μl di inoculo di tachizoiti sono stati aggiunti 10 μl di TMRM (Invitrogen, Molecular Probes) 400 nM, diluita in RPMI 1640 con il 2% di FBS, e 40 μl di agarosio al 3% sciolto a una temperatura di circa 50°C. 50 μl di tale sospensione sono stati depositati a solidificare su un vetrino in una apposita celletta per microscopia confocale.

Dopo 40 minuti di incubazione a 37°C, al buio, la celletta è stata posta in un sistema di incubazione che permette un continuo controllo nel tempo di temperatura e livelli di CO₂ (Kit Cell Observer, Carl Zeiss) per l'osservazione al microscopio.

I mitocondri di tachizoiti di *T. gondii* sono anche stati marcati con TMRM e osservati in esperimenti in *time-lapse*, sia in assenza di peptide (controllo), sia a seguito dell'aggiunta di KP alla concentrazione di 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$, e seguiti per 3 ore, acquisendo immagini sequenziali dello stesso campo a diversi intervalli di tempo per ogni condizione sperimentale.

L'osservazione delle cellule è stata condotta tramite il microscopio confocale a scansione laser LSM 510 Meta integrato con il microscopio invertito Axiovert 200 M (Carl Zeiss), attraverso un obiettivo a immersione in olio 63 $\times$ /1.4.

Le immagini acquisite sono state processate utilizzando un programma specifico per il microscopio.

Per ciascuna condizione di trattamento è stata calcolata l'intensità media di fluorescenza di sezioni acquisite da sei campi selezionati in maniera casuale.

Microscopia elettronica a trasmissione

Gli studi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) sono stati eseguiti in collaborazione con la Dott.ssa Tiziana D'Adda del Laboratorio di Anatomia Patologica, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Parma.

Tachizoiti di *T. gondii*, preparati come precedentemente descritto, sono stati risospesi alla concentrazione finale di 1×10^8 tachizoiti/ml in RPMI 1640 supplementato con il 2% di FBS. 250 μ l di tale sospensione sono stati incubati in un volume finale di 500 μ l, in assenza e presenza di 50 e 100 μ g/ml di KP, a 37°C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Dopo 3 ore, ciascun campione è stato prefissato con 500 μ l di fissativo di Karnovsky per 30 minuti, e, successivamente, centrifugato a 1800 *g* per 10 minuti, a 4°C.

I pellet ottenuti sono stati trasferiti in pozzetti scavati in agarosio al 3% solidificato, successivamente ricoperti con agarosio mantenuto a 56°C.

Dopo gelificazione, le porzioni di agarosio contenenti il pellet cellulare sono state tagliate e i tachizoiti sono stati fissati tramite immersione in fissativo di Karnovsky per 3 ore a temperatura ambiente, lasciati a 4°C per una notte, e infine processati per la microscopia elettronica.

I tachizoiti inclusi nei cubetti di agarosio sono stati lavati più volte in tampone fosfato 0,1 M a pH 7,4 per rimuovere il fissativo, post-fissati per 45 minuti in una soluzione di tetrossido di osmio (OsO₄) all'1%, lavati in tampone fosfato e disidratati mediante immersione in acetone a concentrazioni progressivamente crescenti (25%, 2 volte per 5 minuti; 50% per 10 minuti; 70% per 10 minuti; 95%, 2 volte per 10 minuti; 100%, 5 volte per 5 minuti).

Successivamente i campioni sono stati infiltrati con diversi passaggi in resina epossidica Durcupan Araldite ACM1, lasciati una notte in ACM1 e successivamente inclusi in resina Durcupan Araldite ACM2. La polimerizzazione della resina è stata ottenuta incubando i tachizoiti a 58°C per 72 ore.

Sono state poi tagliate sezioni semi-fini dello spessore di 0,75 μ m, che sono state colorate con blu di metilene e safranina, al fine di verificare la presenza di una quantità di cellule adeguata. Dalle regioni più idonee sono state ricavate sezioni ultrasottili dello spessore di 80 nm, che sono state poi colorate con acetato di uranile al 4% per 20 minuti, lasciate in citrato di piombo di Reynold per 8 minuti e, infine, osservate al microscopio elettronico a trasmissione EM208S (Philips-FEI), lavorando a un voltaggio di 80 kV.

Valutazione dell'attività di KP e dei peptidi da esso derivati nei confronti di *P. falciparum*

In collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari dell'Università degli Studi di Milano, l'attività di KP e di cinque peptidi da esso derivati (K10S, K10S-I, K10S-SS, K10T-TT e R10S-RR) è stata valutata *in vitro* nei confronti di forme asessuate di due ceppi di *P. falciparum*, uno sensibile e uno resistente a cloroquina, e di forme sessuate di un ceppo di *P. falciparum* ricombinante, cloroquina-sensibile.

Saggio della lattato deidrogenasi parassitaria in forme asessuate di *P. falciparum*

I peptidi selezionati sono stati saggiati *in vitro* nei confronti delle forme asessuate dei due ceppi di *P. falciparum* D10 (cloroquina-sensibile) e W2 (cloroquina-resistente).

L'attività dei peptidi è stata quantificata come inibizione della vitalità del protozoo misurata attraverso l'attività della lattato deidrogenasi parassitaria (pLDH).

LDH è l'ossidoreduttasi che catalizza la riduzione del piruvato a lattato utilizzando come cofattore nicotinammide adenina dinucleotide (NAD). Una sostituzione amminoacidica tra pLDH e LDH umana (hLDH) permette a pLDH di utilizzare come cofattore nella reazione 3-acetil piridina adenina dinucleotide (APAD⁺) in maniera trecento volte più efficiente di hLDH [110]. Questa differenza può essere sfruttata per determinare in modo specifico l'attività della pLDH rispetto alla hLDH eritrocitaria fornendo APAD⁺ in combinazione con lattato. Il lattato viene convertito a piruvato riducendo l'APAD⁺ ad APADH, il quale può a sua volta causare la riduzione del cromogeno nitro blu tetrazolio cloruro (giallo) a diformazano (blu), misurabile spettrofotometricamente a 650 nm.

I ceppi D10 e W2 sono stati mantenuti al 5% di ematocrito (eritrociti umani, gruppo sanguigno A+, ottenuti da volontari sani, AVIS, Milano) in RPMI 1640 con l'aggiunta di 1% AlbuMax, ipoxantina 0,37 mM, acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico (HEPES) 20 mM e L-glutamina 2 mM, a 37°C in atmosfera all'1% di O₂, 5% di CO₂ e 94% di N₂.

In una micropiastra da 96 pozzetti a fondo piatto, diverse diluizioni dei peptidi (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/ml) sono state incubate con una coltura di plasmodi con parassitemia pari all'1-1,5% ed ematocrito pari all'1%, in un volume finale di 200 µl/pozzetto. Come bianco sono stati utilizzati eritrociti non infettati e come controllo positivo eritrociti infettati in assenza di peptide. La micropiastra è stata incubata a 37°C in atmosfera all'1-3% di O₂, 5% di CO₂ e 92-94% di N₂.

Dopo 72 ore, in due nuove micropiastre da 96 pozzetti sono stati dispensati 100 µl/pozzetto di reagente MALSTAT (0,11% Triton-100, L-lattato di litio 115,7 mM, Tris 30,27 mM, APAD

0,62 mM, portato a pH 9 con HCl) e 25 µl/pozzetto di reagente PES/NBT (nitro blu tetrazolio cloruro 1,96 mM e fenazina etosolfato 0,24 mM).

Dopo aver accuratamente risospeso gli eritrociti, 20 µl di sospensione sono stati trasferiti nei pozzetti corrispondenti delle due nuove micropiastre. La crescita parassitaria è stata quantificata attraverso la misurazione dell'attività della pLDH utilizzando lo spettrofotometro per micropiastre Synergy4 (BioTek Instruments) alla lunghezza d'onda di 650 nm.

Ogni saggio è stato eseguito in doppio, a scopo statistico, in due esperimenti indipendenti.

L'attività dei peptidi esaminati è stata espressa come concentrazione efficace 50 (EC₅₀), ossia la concentrazione di peptide in grado di uccidere il 50% delle cellule saggiate, estrapolata dall'analisi della regressione non lineare delle curve dose-risposta attraverso il software Gen5 1.10 (BioTek Instruments). La percentuale di vitalità dei parassiti è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\% \text{ di vitalità} = 100 \times \frac{(\text{OD campioni trattati} - \text{OD bianco})}{(\text{OD campioni non trattati} - \text{OD bianco})}$$

dove bianco corrisponde ai campioni di eritrociti non infettati.

Saggio della luciferasi in gametociti di *P. falciparum*

E' stata valutata l'attività di KP e dei cinque peptidi da esso derivati, K10S, K10S-I, K10S-SS, K10T-TT e R10S-RR, su gametociti di *P. falciparum*, ottenuti da colture di forme asessuate del ceppo 3D7 *elo1-pfs16*-CBG99 transgenico (clorochina-sensibile) che esprime la luciferasi CBG99 sotto la regolazione del promotore del gene *pfs16* gametocita-specifico [111,112].

L'attività dei peptidi è stata quantificata come inibizione della vitalità del parassita e misurata attraverso l'attività della luciferasi.

Il ceppo 3D7 luminescente è stato mantenuto al 5% di ematocrito (eritrociti umani, gruppo 0+, ottenuti da volontari sani, AVIS, Milano) in RPMI 1640 con l'aggiunta di sodio bicarbonato 27 mM, ipoxantina 0,37 mM, HEPES 25 mM, L-glutammina 2 mM e 10% di siero umano gruppo 0+ inattivato al calore, che assicura costante ed elevata produzione di gametociti, a 37°C in atmosfera all'1-3% di O₂, 5% di CO₂ e 92-94% di N₂.

Per dare il via alla gametocitogenesi la coltura di forme asessuate del ceppo 3D7 è stata diluita allo 0,5% di parassitemia e il terreno di crescita è stato cambiato giornalmente senza l'aggiunta di eritrociti freschi. Quando è stato raggiunto un valore di parassitemia >5% e i parassiti sono stati stressati per privazione di nutrienti, le colture sono state trattate per 48-96

ore con N-acetilglucosamina (NAG) 50 mM per eliminare le forme asessuate residue.

Nel saggio sono stati utilizzati gametociti maturi, ossia parassiti allo stadio IV e V del ciclo vitale, ottenuti dopo 7-8 giorni dall'aggiunta di NAG. Lo stadio dei gametociti è stato valutato al microscopio ottico dopo colorazione dei vetrini con Giemsa.

In una micropiastra da 96 pozzetti a fondo piatto, una coltura di gametociti allo 0,5-1% di parassitemia ed ematocrito 1% è stata incubata con diverse diluizioni dei peptidi (200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/ml) in un volume finale di 200 µl di terreno.

Come bianco sono stati utilizzati eritrociti non infettati e come controllo positivo eritrociti infettati in assenza di peptidi.

Per valutare la possibile tossicità del DMSO presente nella soluzione madre dei peptidi, 100 µl di gametociti sono stati aggiunti a 100 µl di DMSO opportunamente diluito in terreno per ottenere la massima concentrazione presente nelle soluzioni dei peptidi utilizzate.

La micropiastra è stata incubata a 37°C in atmosfera all'1% di O₂, 5% di CO₂ e 94% di N₂ per 72 ore, quindi da ogni pozzetto sono stati rimossi 100 µl al fine di ridurre l'ematocrito. Dopo aver accuratamente risospeso gli eritrociti rimasti, 70 µl di sospensione sono stati trasferiti nei pozzetti corrispondenti di una micropiastra da 96 pozzetti nera contenenti 70 µl di D-luciferina (1 mM in tampone citrato 0,1 M, pH 5,5).

Ogni saggio è stato eseguito in doppio, a scopo statistico, in due esperimenti indipendenti.

La vitalità dei gametociti è stata quantificata attraverso rilevazione dell'emissione di bioluminescenza. L'attività dei peptidi è stata espressa come EC₅₀, estrapolata dall'analisi della regressione non lineare delle curve dose-risposta come precedentemente descritto.

Valutazione dell'attività di KP e dei peptidi da esso derivati nei confronti di *Leishmania infantum* e *L. tropica*

In collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari dell'Università degli Studi di Milano è stata valutata l'attività *in vitro* di KP e dei cinque peptidi derivati, K10S, K10S-I, K10S-SS, K10T-TT e R10S-RR, nei confronti di promastigoti di *L. infantum* e *L. tropica* e di amastigoti di *L. infantum*.

Saggio di vitalità di promastigoti di *L. infantum* e *L. tropica*

KP e i cinque peptidi derivati, K10S, K10S-I, K10S-SS, K10T-TT e R10S-RR, sono stati saggiati *in vitro* nei confronti di promastigoti di *L. tropica* MHOM/IT/2012/ISS3130, di

isolamento clinico, ottenuta dal Policlinico di Milano, e *L. infantum* MHOM/TN/80/IPT1, ottenuta dall'Istituto Superiore di Sanità di Roma.

L'attività antiparassitaria dei peptidi è stata valutata come inibizione della vitalità della forma extracellulare del parassita e quantificata mediante un saggio colorimetrico con MTT.

I promastigoti di *L. tropica* e *L. infantum* sono stati mantenuti in incubazione a 24°C in fiasche da 25 cm² in un volume totale di 3 ml di terreno Schneider's *Drosophila* supplementato con 10% FBS, 2% HEPES e 2% L-glutammina, a pH 7.4, generando subcolture in nuove fiasche tre volte a settimana mediante diluizione di 300 µl di coltura in crescita esponenziale in 3 ml di terreno fresco.

In una micropiastra da 96 pozzetti a fondo tondo, una coltura di promastigoti alla concentrazione di 5×10⁶ cellule/ml è stata incubata con diverse diluizioni dei peptidi (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/ml) in un volume finale di 200 µl di RPMI 1640 supplementato con 10% FBS, HEPES 25 mM e L-glutammina 2 mM.

Come bianco è stato utilizzato il solo terreno di coltura e come controllo positivo promastigoti coltivati in assenza di peptide.

La micropiastra è stata incubata a 24°C, per 72 ore, quindi sono stati aggiunti 20 µl/pozzetto di MTT (5 mg/ml) lasciando sviluppare la reazione a temperatura ambiente, al buio, per 3 ore. Le piastre sono state centrifugate a 1700 g per 7 minuti, è stato eliminato il surnatante e sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di un tampone di lisi costituito da 20% sodio dodecilsolfato (SDS) e 40% N,N-dimetilformammide in acqua.

Le piastre sono state quindi incubate a temperatura ambiente, al buio, per una notte.

La vitalità cellulare è stata quantificata misurando spettrofotometricamente l'MTT ridotto (550 nm).

Ogni saggio è stato eseguito in doppio, a scopo statistico, in tre esperimenti indipendenti.

I risultati sono stati espressi come valori di EC₅₀ estrapolati dall'analisi della regressione non lineare delle curve dose-risposta come precedentemente descritto.

Saggio di tossicità dei peptidi selezionati in cellule THP-1

La citotossicità di tutti i peptidi nei confronti di cellule THP-1, una linea monocitica umana in sospensione ottenuta dal sangue periferico di un paziente con leucemia mieloide acuta, è stata valutata mediante saggio colorimetrico con MTT.

Cellule THP-1 sono state coltivate in terreno liquido RPMI 1640 supplementato con 10% FBS, 1% L-glutammina, 2% HEPES, 1% sodio piruvato e 0,05 mM beta-mercaptoetanolo, in fiasche da 75 cm², mantenute in ambiente umidificato in incubatore a 37°C in atmosfera al

5% di CO₂. Subcolture sono state generate due volte a settimana mediante diluizione (1:4) in terreno fresco.

Per il saggio di tossicità, le cellule sono state seminate in piastre per colture cellulari da 96 pozzetti a fondo tondo alla concentrazione di 5×10^5 cellule/ml in presenza di 1 µg/ml di forbolo miristato acetato (PMA), in un volume finale di terreno pari a 200 µl per pozzetto. La piastra è stata incubata a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Dopo 72 ore, il surnatante è stato rimosso e sono stati aggiunti in ogni pozzetto 200 µl di peptidi, diluiti in terreno alla concentrazione di 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/ml. Come bianco è stato utilizzato il terreno di coltura e come controllo positivo cellule coltivate in assenza di peptidi.

La piastra è stata reincubata a 37°C in presenza del 5% di CO₂ per 72 ore e successivamente sono stati aggiunti in ogni pozzetto 20 µl di MTT alla concentrazione finale di 5 mg/ml. La reazione è stata sviluppata a 37°C in presenza del 5% di CO₂, al buio, per 3 ore.

Dopo aver eliminato il surnatante, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di SDS e la piastra è stata incubata a temperatura ambiente, al buio, per una notte.

L'assorbanza è stata misurata mediante spettrofotometro (550 nm) valutando la vitalità cellulare come precedentemente descritto.

Ogni concentrazione di peptide è stata saggiata in doppio.

Saggio di inibizione dell'infettività di *L. infantum*

KP e quattro peptidi derivati, K10S, K10S-I, K10T-TT e R10S-RR, sono stati saggiati *in vitro* per la valutazione della loro capacità di inibire l'infettività di *L. infantum* in cellule THP-1.

Promastigoti di *L. infantum* sono stati mantenuti in coltura come precedentemente descritto, generando promastigoti metaciclici (forma in grado di infettare i macrofagi) mediante coltura senza aggiunta di terreno fresco per 5 giorni.

Cellule THP-1 sono state seminate in piastre per colture su vetrino da 16 pozzetti, a una concentrazione finale pari a 5×10^5 cellule/ml, in presenza di PMA (1 µg/ml) in un volume finale di 200 µl di terreno per pozzetto. Le piastre sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ per 48 ore, sostituendo poi il surnatante con 200 µl di terreno fresco per evitare gli effetti tossici dovuti alla permanenza di PMA.

In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di una sospensione di promastigoti in fase metaciclica a una concentrazione finale di 5×10^6 cellule/ml e le piastre sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂, per 24 ore, quindi il surnatante è stato eliminato e sostituito con 200 µl di terreno fresco contenente 200 µg/ml di ciascun peptide.

Come controlli sono stati utilizzati quattro pozzetti per ogni vetrino in cui erano presenti cellule parassitate in assenza di peptidi.

Le piastre sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂, per 72 ore.

Il surnatante è stato eliminato e, dopo la rimozione dai pozzetti, i vetrini sono stati opportunamente fissati, colorati con Giemsa, e osservati al microscopio ottico (100×).

Le percentuali di inibizione dell'infezione sono state calcolate secondo la seguente formula:

$$\% \text{ di inibizione dell'indice di infezione} = 100 - \frac{\text{N}^\circ \text{ cellule infette in presenza di peptidi}}{\text{N}^\circ \text{ cellule infette nel controllo}} \times 100$$

L'esperimento è stato successivamente ripetuto utilizzando una concentrazione di peptidi pari a 50 µg/ml, saggiando ogni peptide in triplo.

RISULTATI

Attività di KP nei confronti di tachizoiti extracellulari di *Toxoplasma gondii*

Tossicità di KP nei confronti di cellule Vero

I saggi per la valutazione della citotossicità del peptide KP nei confronti di cellule Vero in coltura hanno evidenziato che la presenza di KP fino a concentrazioni pari a 200 µg/ml non determina una riduzione della vitalità cellulare, rispetto alle cellule di controllo coltivate in assenza di peptide (**Figura 16**).

Solo in presenza della più alta concentrazione saggiata di peptide (400 µg/ml), la vitalità delle cellule Vero è risultata pari al 77% rispetto alle cellule di controllo.

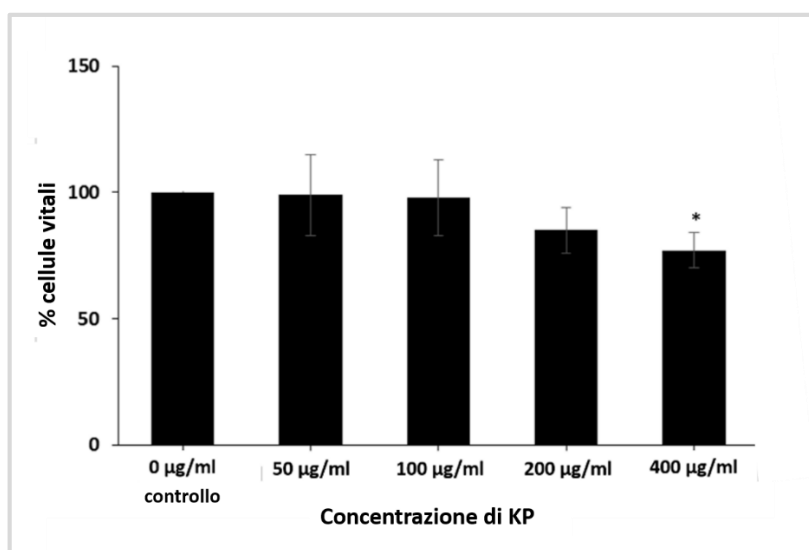


Figura 16. Vitalità di cellule Vero in presenza di diverse concentrazioni di KP. Le cellule sono state incubate in assenza (controllo) e presenza di KP a concentrazioni crescenti (50, 100, 200 e 400 µg/ml) in RPMI 1640 con il 5% di FBS, per 24 ore, a 37°C, in atmosfera umidificata al 5% CO₂. I risultati sono espressi come valori percentuali di vitalità cellulare, valutata mediante saggio colorimetrico con MTT, in relazione al controllo in assenza di peptide. I dati riportati rappresentano i valori medi ($\pm$ deviazione standard) ottenuti in due esperimenti indipendenti eseguiti in triplo. * $P < 0,05$.

Effetto di KP sull'invasione e sulla proliferazione intracellulare di *T. gondii* in cellule Vero

I preparati di cellule Vero infettate con tachizoiti di *T. gondii* sono stati osservati al microscopio ottico dopo colorazione di Giemsa modificata e sono stati determinati l'indice di infezione (numero di cellule infette su 200 cellule esaminate) e la proliferazione intracellulare (numero totale di tachizoiti in 200 cellule esaminate) in assenza e in presenza di diverse concentrazioni di KP e del peptide *scrambled* SP (**Figura 17**).

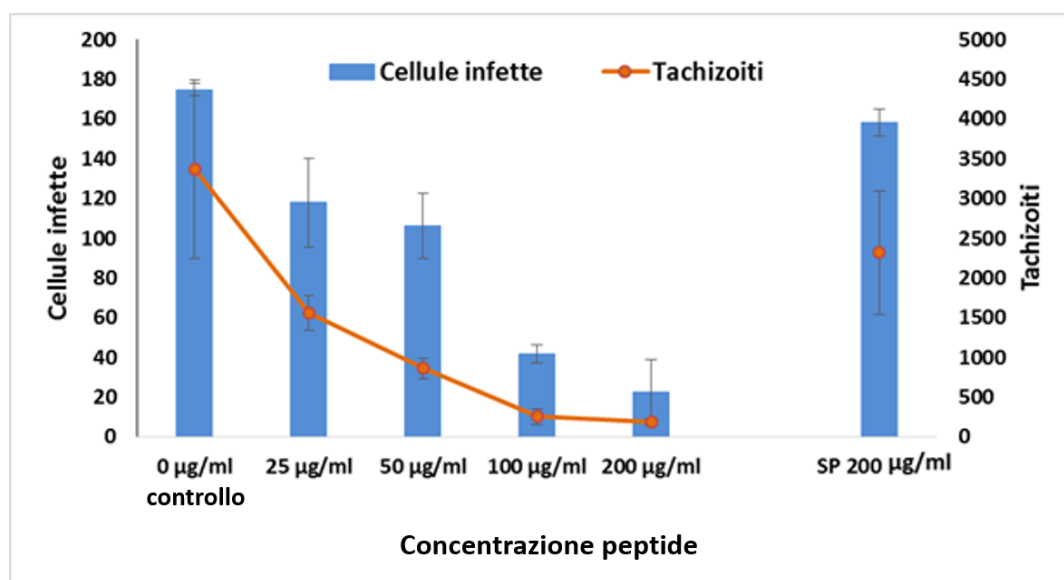


Figura 17. Indice di infezione e proliferazione intracellulare di *T. gondii* in cellule Vero in assenza e in presenza di diverse concentrazioni di KP e SP. I risultati sono espressi come valori medi ($\pm$ deviazione standard) derivati dall'osservazione di almeno tre vetrini per ciascuna condizione di saggio.

In **Tabella 2** sono riportati i valori percentuali di inibizione dell'indice di infezione e della proliferazione intracellulare dei tachizoiti in riferimento alle cellule infettate in assenza di peptide, mentre in **Figura 18** sono mostrate immagini rappresentative dei preparati esaminati. A ciascuna delle concentrazioni saggate, KP si è mostrato in grado di ridurre in maniera significativa sia l'indice di infezione sia la proliferazione intracellulare. L'inibizione dell'indice di infezione è risultata pari al 33% a 25 µg/ml di KP, arrivando all'87% alla concentrazione di 200 µg/ml. L'inibizione della proliferazione intracellulare è risultata invece pari al 54% a 25 µg/ml di KP, raggiungendo il 95% alla massima concentrazione saggiata. Il trattamento con SP non ha ridotto in maniera significativa né l'indice di infezione né la proliferazione intracellulare.

Tabella 2. Percentuale di inibizione dell'indice di infezione e della proliferazione intracellulare parassitaria in cellule Vero infettate con *T. gondii* in assenza e presenza di diverse concentrazioni dei peptidi KP e SP.

Concentrazione di peptide	Indice di infezione Inibizione %	Proliferazione intracellulare Inibizione %
KP 0 µg/ml	-	-
KP 25 µg/ml	33	54
KP 50 µg/ml	39	75
KP 100 µg/ml	76	92
KP 200 µg/ml	87	95
SP 200 µg/ml	9	31

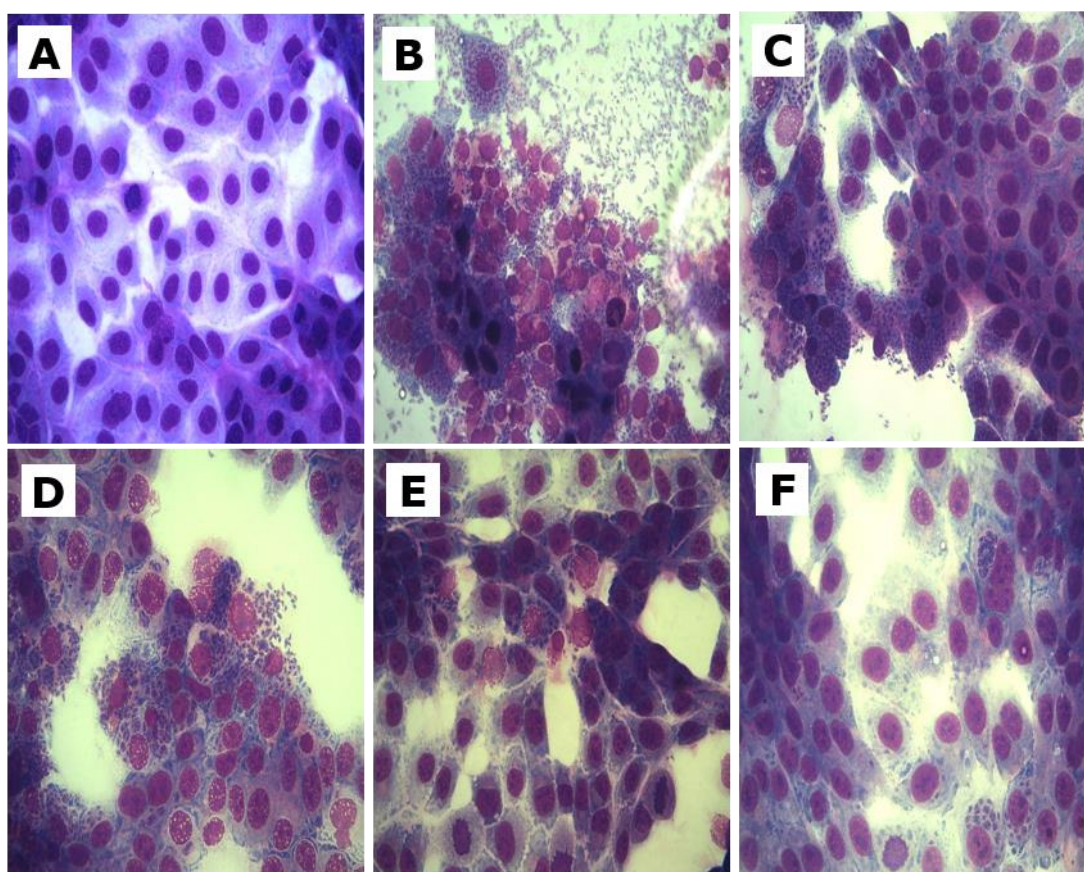


Figura 18. Microscopia ottica (40×) di cellule Vero coltivate in piastre per colture su vetrino dopo colorazione di Giemsa modificata. Cellule Vero non infettate (A), cellule Vero infettate con *T. gondii* in assenza di KP (B), cellule Vero infettate con *T. gondii* in presenza di KP alla concentrazione di 25 µg/ml (C), 50 µg/ml (D), 100 µg/ml (E) e 200 µg/ml (F).

Effetto di KP sull'infezione da *T. gondii* in cellule Vero valutato mediante rilevamento del DNA parassitario

I risultati della valutazione mediante real-time qPCR del DNA parassitario in cellule Vero infettate e trattate per 3 ore con diverse concentrazioni di KP e di SP hanno evidenziato una riduzione della quantità relativa di DNA (DNA vs t_0 , cioè DNA estratto dopo 3 ore di incubazione in assenza o in presenza di peptide) in presenza di KP a tutti i tempi valutati (24, 48 o 72 ore dall'infezione) (**Figura 19**). La riduzione è risultata più evidente dopo 48 e 72 ore dall'infezione con una differenza statisticamente molto significativa rispetto al controllo (cellule infettate in assenza di peptide) per tutte le concentrazioni di KP utilizzate. La quantità di DNA ottenuta dalle cellule infettate in presenza di SP è risultata molto simile a quella ottenuta nel controllo.

L'osservazione al microscopio ottico delle cellule Vero infettate in assenza o in presenza di KP prima della raccolta del materiale per l'estrazione del DNA parassitario ha evidenziato la riduzione del numero di tachizoiti in presenza del peptide a tutte le concentrazioni saggiate, sia a 24, sia a 48 sia a 72 ore (**Figura 20**).

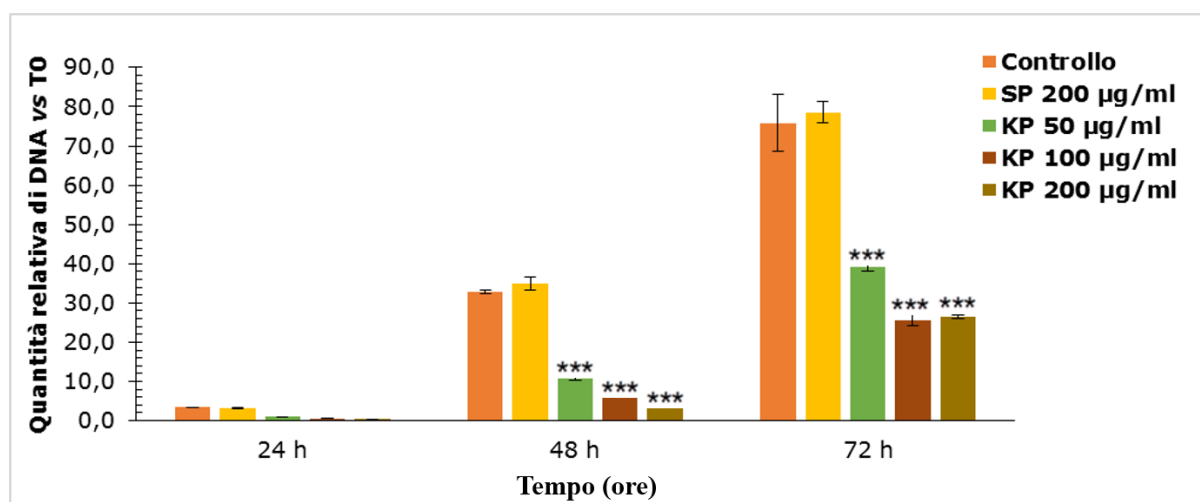


Figura 19. Quantità relativa di DNA di *T. gondii* rilevata mediante real-time qPCR a 24, 48 e 72 ore in cellule Vero infettate incubate per 3 ore in assenza (controllo) e in presenza di diverse concentrazioni di KP e SP. I risultati sono espressi come valori medi ($\pm$ deviazione standard) in relazione alla quantità di DNA estratto dopo 3 ore dall'infezione (t_0), ottenuti in esperimenti eseguiti in triplo. *** $P < 0,001$ rispetto al controllo come stabilito mediante analisi della varianza (ANOVA) a una via utilizzando il test *post hoc* di Tukey.

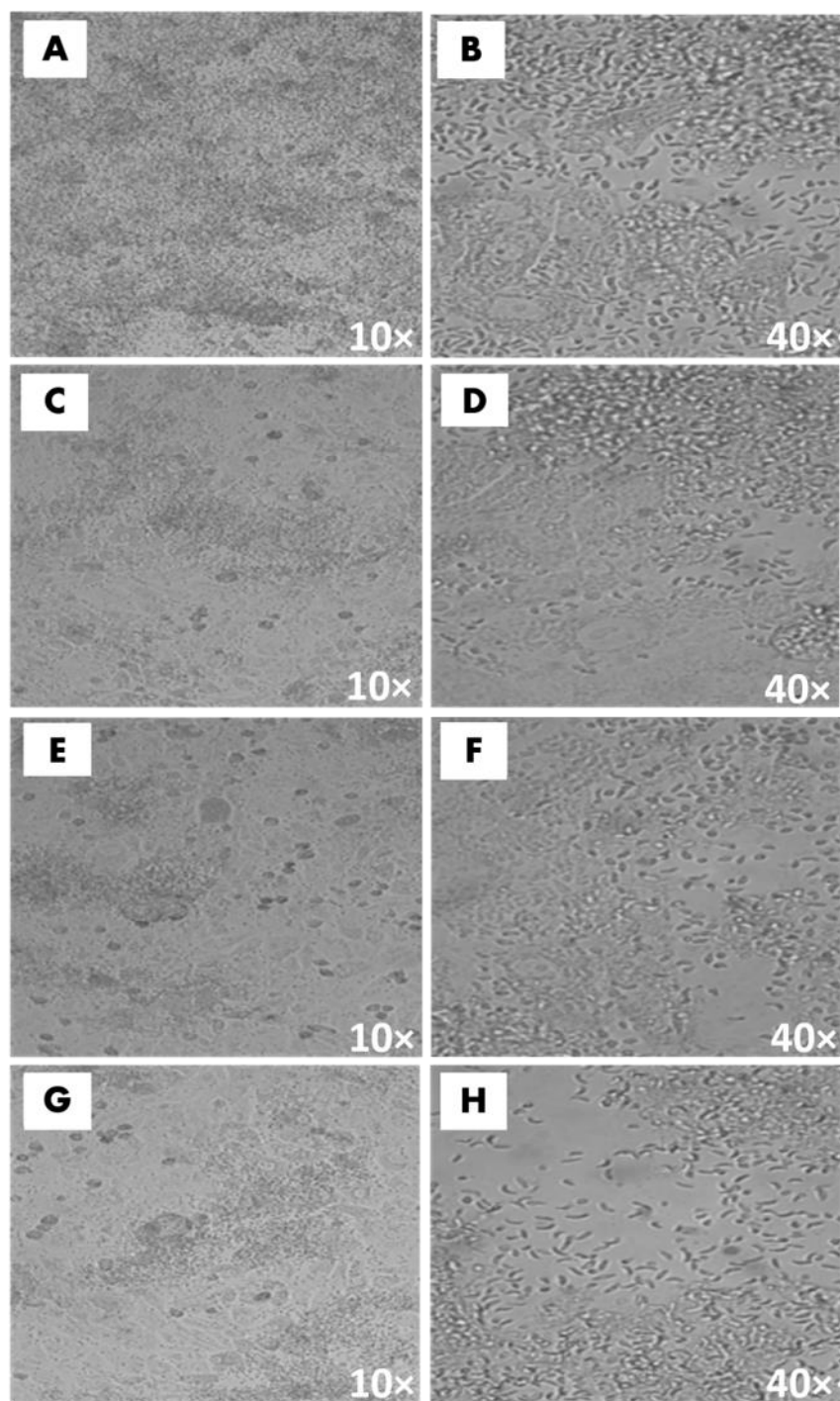


Figura 20. Microscopia ottica (10×, 40×) di cellule Vero coltivate in piastre per colture cellulari da 12 pozzetti dopo 72 ore dall'infezione con *T. gondii*. Cellule infettate in assenza di peptide (**A, B**), cellule infettate in presenza di KP a 50 µg/ml (**C, D**), 100 µg/ml (**E, F**) e 200 µg/ml (**G, H**) per 3 ore.

Effetto di KP sull'esternalizzazione della fosfatidilserina come indicatore di apoptosi in tachizoiti di *T. gondii*

L'eventuale induzione di apoptosi in tachizoiti extracellulari di *T. gondii* è stata valutata a seguito dell'incubazione del parassita per 3, 24 e 48 ore in presenza di KP alla concentrazione di 50 e 100 µg/ml utilizzando il citofluorimetro Muse Cell Analyzer e il kit "Muse Annexin V & Dead Cell Assay".

Nelle condizioni sperimentali adottate, a tutti i tempi analizzati è stato riscontrato un significativo aumento della percentuale media di cellule in apoptosi precoce (Annessina V positive e 7-AAD negative) in seguito a trattamento con KP ad entrambe le concentrazioni utilizzate, comparativamente al controllo non trattato.

In particolare, è stato osservato che l'induzione dell'esternalizzazione di fosfatidilserina nei tachizoiti avviene in maniera rapida e dose-dipendente; già dopo 3 ore, infatti, i valori percentuali medi di cellule in apoptosi precoce sono risultati pari a 35,74% in presenza di KP a 50 µg/ml e 66,93% in presenza di KP a 100 µg/ml. Inoltre, l'induzione non è risultata tempo-dipendente, poiché non sono state riscontrate differenze significative tra i valori ottenuti dopo 3, 24 e 48 ore di trattamento a nessuna delle due concentrazioni utilizzate (Figura 21).

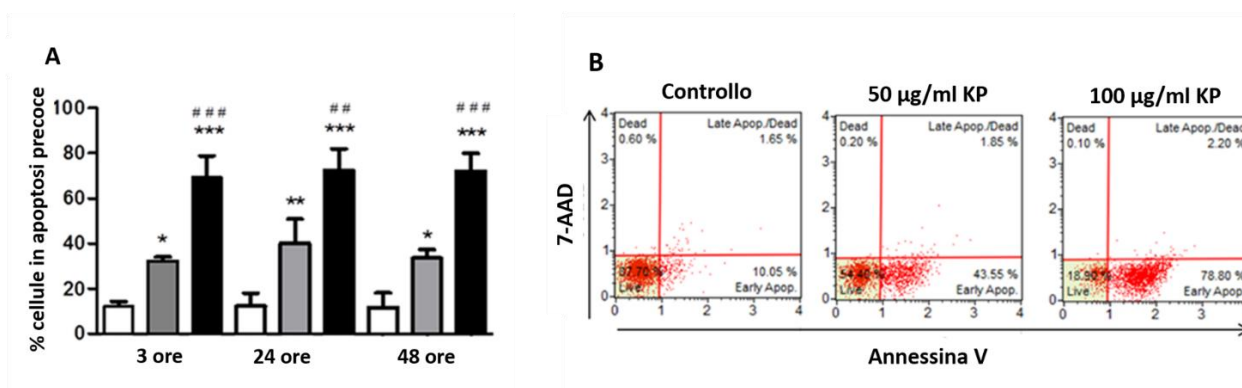


Figura 21. Effetto del trattamento con KP sull'esternalizzazione di fosfatidilserina in tachizoiti extracellulari di *T. gondii*. **(A)** Valori percentuali medi di cellule in apoptosi precoce, ottenuti in tre esperimenti indipendenti, con cellule incubate 3, 24 e 48 ore in assenza (colonne bianche, controllo) o in presenza di KP a 50 µg/ml (colonne grigie) e 100 µg/ml (colonne nere). I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ rispetto al controllo; ### $P < 0,01$, #### $P < 0,001$ rispetto a 50 µg/ml di KP come stabilito mediante analisi della varianza (ANOVA) e analisi di Tuckey *post hoc*. **(B)** Immagini rappresentative del profilo apoptotico ottenuto utilizzando il kit "Muse Annexin V & Dead Cell Assay" in tachizoiti incubati per 3 ore in assenza (controllo) o in presenza di 50 e 100 µg/ml di KP.

Effetto di KP sulla frammentazione del DNA in tachizoiti di *T. gondii* valutato mediante saggio TUNEL

L'analisi in citofluorimetria a flusso utilizzando il saggio TUNEL ha permesso di rilevare l'induzione da parte di KP di rotture nei filamenti di DNA di tachizoiti extracellulari di *T. gondii*.

Come mostrato in **Figura 22**, la percentuale media di cellule positive al saggio TUNEL è risultata del 19% in tachizoiti appena isolati incubati in terreno in assenza di KP, valore che è risultato mantenersi relativamente stabile per 3, 24 e 48 ore.

La percentuale di cellule con DNA frammentato è risultata significativamente più elevata in tachizoiti trattati con 50 µg/ml di KP per 24 ore (39%) e 48 ore (56%), ma non per 3 ore, rispetto al controllo in assenza di peptide. Invece, in tachizoiti trattati con 100 µg/ml la percentuale non è risultata significativamente differente da quella del controllo, mostrando valori relativamente invariati a tutti i tempi di saggio.

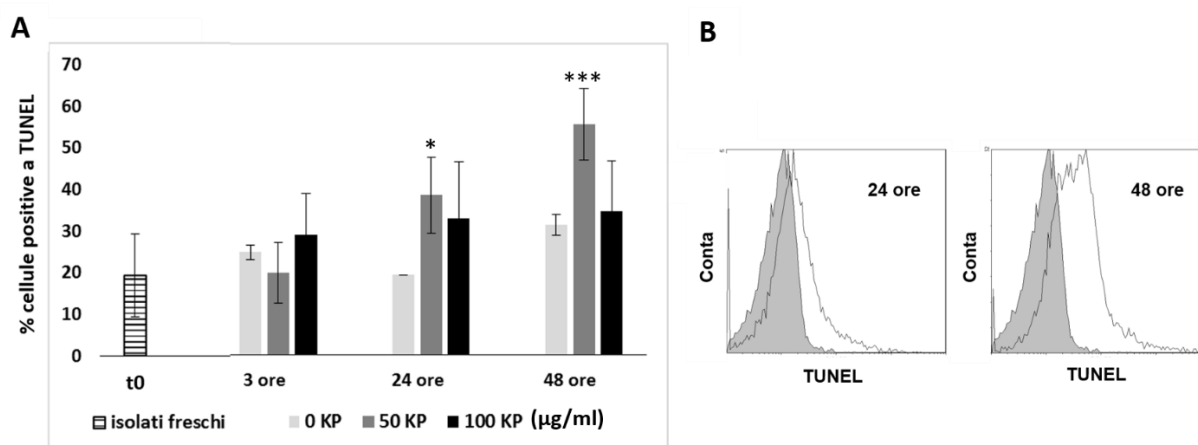


Figura 22. Effetto del trattamento con KP sulla frammentazione del DNA in tachizoiti di *T. gondii* rilevato mediante citofluorimetria a flusso con saggio TUNEL. **(A)** Percentuale di cellule positive al saggio TUNEL in tachizoiti isolati al momento (t_0 , colonna tratteggiata) e incubati per 3, 24 e 48 ore in assenza (colonne grigio chiaro) o in presenza di KP a 50 µg/ml (colonne grigio scuro) e 100 µg/ml (colonne nere). I dati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard di due esperimenti indipendenti e comparati con test t di Student rispetto al valore t_0 (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$). **(B)** Immagini rappresentative ottenute in citofluorimetria a flusso per l'identificazione di DNA frammentato in tachizoiti di *T. gondii* dopo 24 e 48 ore di incubazione in assenza (grigio) e in presenza di KP a 50 µg/ml (bianco).

Effetto di KP sul potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) in tachizoiti di *T. gondii* valutato mediante microscopia confocale a scansione laser

L'osservazione al microscopio confocale a scansione laser di tachizoiti di *T. gondii* marcati con TMRM in saggi *end-point* e *time-lapse* ha permesso di valutare variazioni del $\Delta\Psi_m$ nel tempo, in relazione alla presenza o assenza del peptide KP.

Un saggio preliminare condotto con FCCP ha confermato la capacità di TMRM di legarsi specificamente ai mitocondri dei tachizoiti. Infatti 4 minuti dopo l'aggiunta del disaccoppiante alle cellule marcate è stato possibile osservare una effettiva perdita del $\Delta\Psi_m$.

Sono stati quindi valutati i cambiamenti di $\Delta\Psi_m$ dopo trattamento con KP osservando la capacità di caricamento di TMRM da parte dei mitocondri dei tachizoiti.

In particolare, l'analisi dei tachizoiti utilizzati come controllo ha mostrato che i parassiti extracellulari mantenuti per 18 ore in terreno in assenza di peptide conservano la capacità di sequestrare TMRM nei mitocondri, mantenendo inalterato il $\Delta\Psi_m$ (100% di intensità di fluorescenza).

Al contrario, dopo 18 ore dall'aggiunta del peptide a 50 $\mu\text{g/ml}$, è stata osservata una riduzione della capacità di caricamento della sonda del 72,6% rispetto al controllo ($P < 0,01$; test *t* di Student), mentre in presenza di 100 $\mu\text{g/ml}$ di KP i mitocondri hanno mostrato la totale scomparsa della capacità di caricamento di TMRM, indicativa di una completa perdita del potenziale di membrana (**Figura 23**).

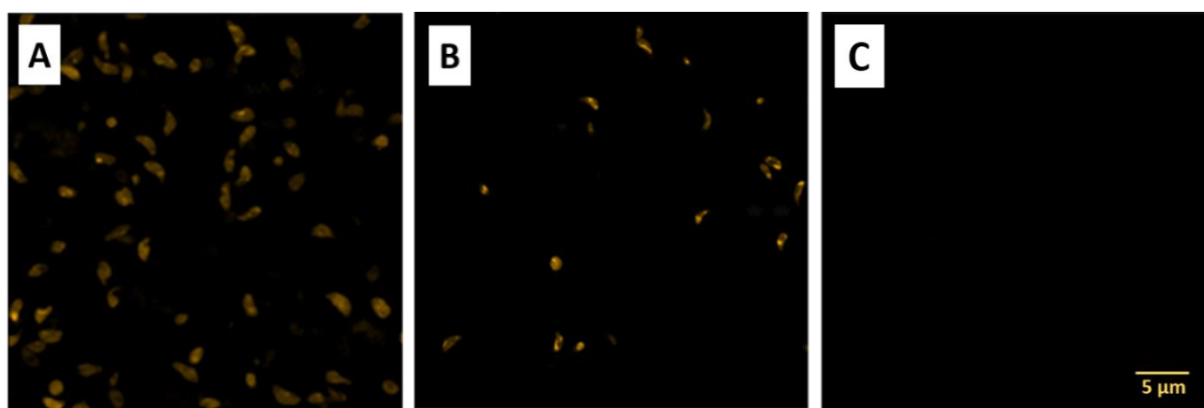


Figura 23. Effetto del trattamento con KP sul caricamento di TMRM in tachizoiti extracellulari di *T. gondii*. Immagini rappresentative in microscopia confocale di tachizoiti incubati per 18 ore in assenza (A) e in presenza di KP a 50 $\mu\text{g/ml}$ (B) e 100 $\mu\text{g/ml}$ (C).

L'osservazione in *time-lapse* di tachizoiti in assenza di peptide (controllo) ha permesso di visualizzare una intensa fluorescenza indicativa della localizzazione della sonda all'interno

del mitocondrio, quindi del mantenimento del $\Delta\Psi_m$ nel tempo.

A partire da 10 minuti dopo l'aggiunta di KP alla concentrazione di 50 $\mu\text{g/ml}$ è stata osservata una progressiva riduzione della capacità di caricamento da parte dei mitocondri, indicativa di una perdita di $\Delta\Psi_m$ (**Figura 24, A-D**).

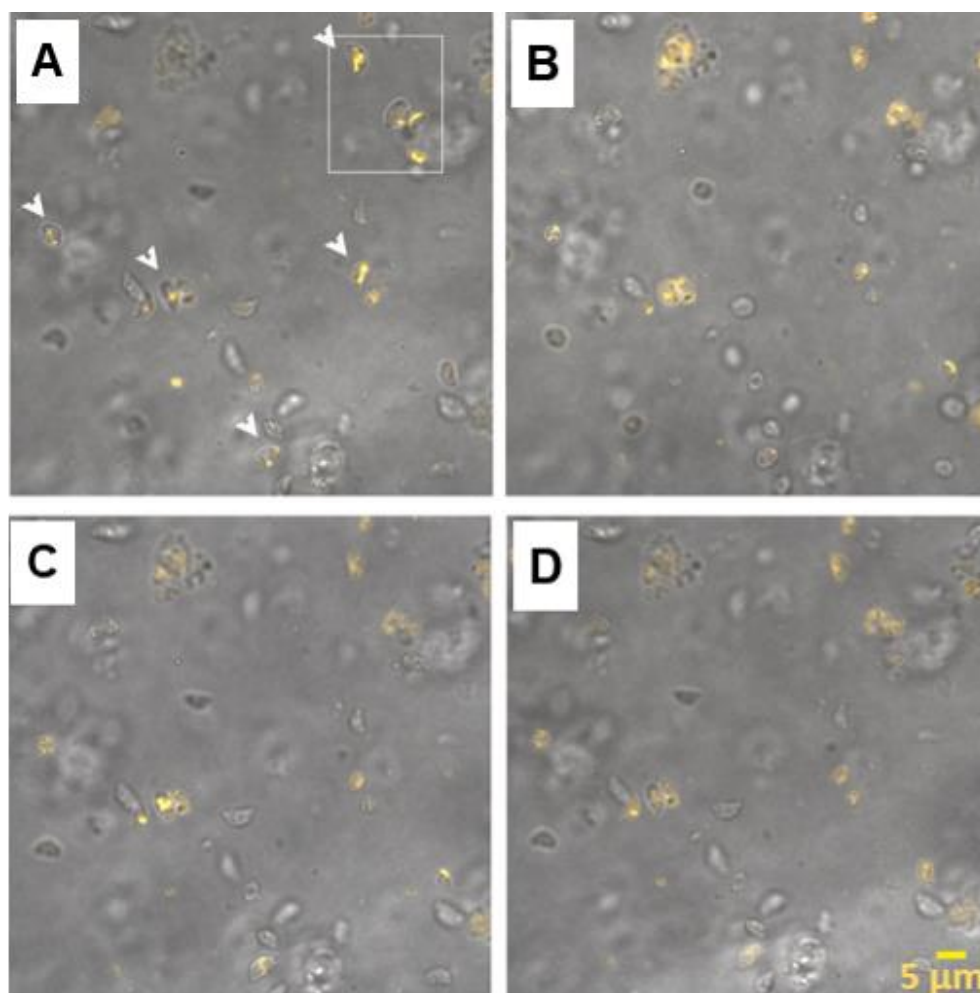


Figura 24. Effetto del trattamento con 50 $\mu\text{g/ml}$ di KP di tachizoiti extracellulari di *T. gondii* marcati con TMRM. Le immagini in microscopia confocale mostrano tachizoiti vitali marcati con TMRM prima (**A**, controllo) e dopo 10 minuti (**B**), 1 ora (**C**) e 2 ore (**D**) dall'aggiunta di KP. È presentato lo stesso campo. Il segnale TMRM e l'immagine a luce trasmessa sono mostrati in sovrapposizione (merge). Le punte di freccia nel pannello A indicano tachizoiti con mitocondri fluorescenti. Una sezione del campo nel pannello A, riportata nel riquadro, è mostrata a maggiore ingrandimento in **Figura 25**.

Le immagini a maggiore ingrandimento di tachizoiti marcati non trattati con il peptide mostrano un accumulo di fluorescenza nel mitocondrio di tipica forma tubulare (**Figura 25, A**

e **B**), mentre dopo 3 ore in presenza di KP sono stati evidenziati rilascio di TMRM dai mitocondri (**Figura 25, C**) e sua dispersione nel citoplasma della cellula morfologicamente alterata (**Figura 25, D**).

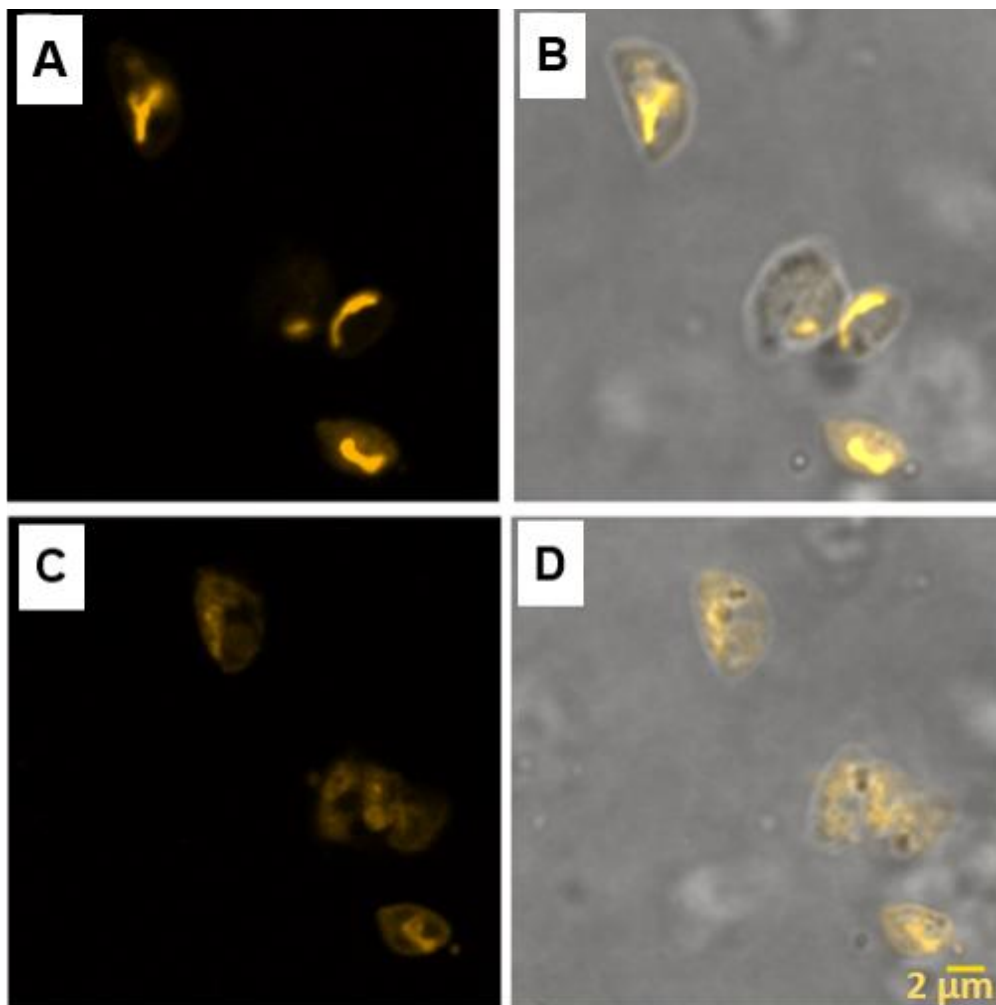


Figura 25. Effetto del trattamento con 50 µg/ml di KP di tachizoiti extracellulari di *T. gondii* marcati con TMRM. Le immagini in microscopia confocale mostrano tachizoiti vitali marcati con TMRM prima (**A** e **B**, controllo) e dopo 3 ore (**C** e **D**) dall'aggiunta di KP. È presentato lo stesso campo mostrato nel riquadro del pannello A di Figura 24. Il solo segnale TMRM è mostrato nei pannelli **A** e **C** e la sovrapposizione con l'immagine a luce trasmessa (merge) nei pannelli **B** e **D**. Dopo 3 ore di incubazione con KP si apprezza una fluorescenza residua che si localizza al di fuori del mitocondrio e la morfologia dei tachizoiti appare alterata.

A seguito dell'aggiunta di KP a 100 µg/ml invece, già dopo 15 minuti è stata osservata una completa perdita della fluorescenza, indicativa della caduta di $\Delta\Psi_m$ (**Figura 26, A-D**).

Continuando l'osservazione per ulteriori 60 minuti non è stato riscontrato ripristino del potenziale.

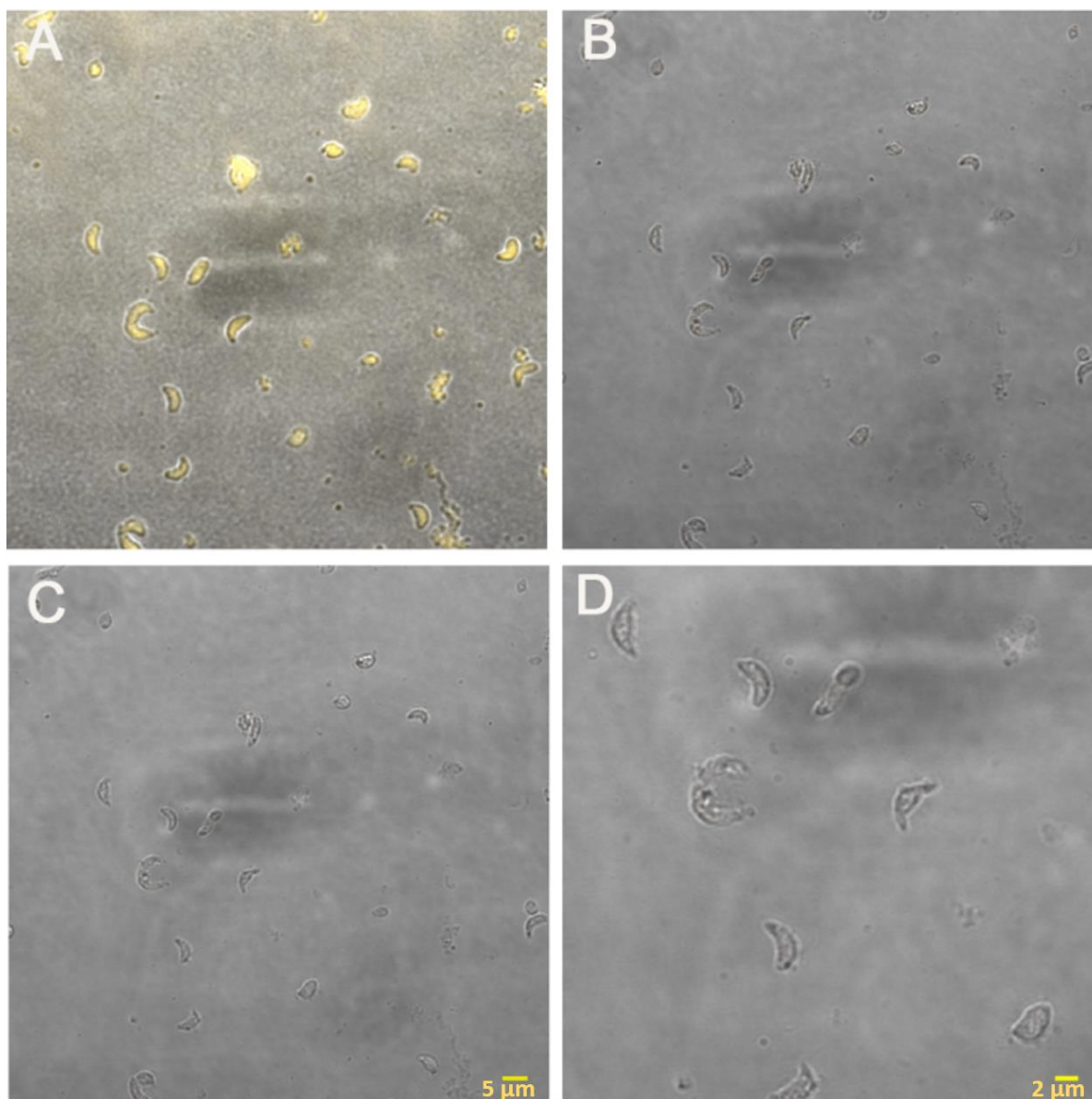


Figura 26. Effetto del trattamento con 100 $\mu\text{g/ml}$ di KP di tachizoiti extracellulari di *T. gondii* marcati con TMRM. Le immagini in microscopia confocale mostrano tachizoiti vitali marcati con TMRM prima (A) e dopo incubazione con KP per 15 minuti (B) e 1 ora (C). È presentato lo stesso campo. Il segnale TMRM e l'immagine a luce trasmessa sono mostrati in merge. Una completa perdita del segnale è evidenziata già dopo 15 minuti di trattamento con il peptide. Una sezione del campo nel pannello C è mostrata a maggiore ingrandimento nel pannello D in cui sono evidenti alterazioni della morfologia dei tachizoiti indotte dall'azione di KP.

Effetto di KP sulla morfologia di tachizoiti di *T. gondii* evidenziato mediante microscopia elettronica a trasmissione

L'osservazione mediante microscopia elettronica a trasmissione ha permesso di apprezzare la morfologia dei tachizoiti extracellulari di *T. gondii* prima e dopo il trattamento con KP.

Tachizoiti incubati in terreno hanno mostrato la tipica morfologia a semiluna con membrane nucleare e cellulare intatte (**Figura 27**). Nell'immagine è possibile apprezzare le diverse strutture cellulari, nucleo ovoidale con ammassi di cromatina, membrana nucleare, membrana cellulare elettrondensa con caratteristico doppio strato interno, microporo, conoide, granuli densi e mitocondrio.

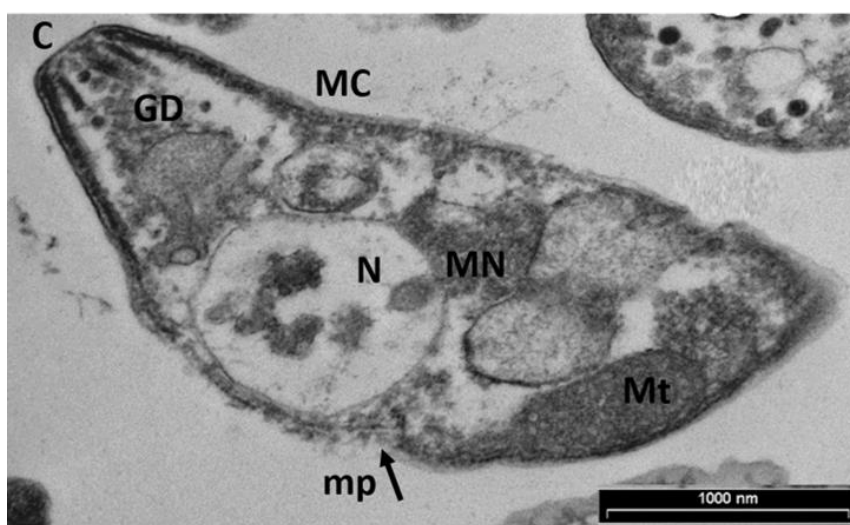


Figura 27. Ultrastruttura di tachizoite di *T. gondii*. L'immagine al microscopio elettronico a trasmissione è stata ottenuta dopo 3 ore di incubazione in terreno RPMI 1640 con il 2% di FBS. N, nucleo; MN, membrana nucleare; mp, microporo; GD, granuli densi; MC, membrana cellulare; Mt, mitocondrio; C, conoide.

Al contrario, a seguito del trattamento con KP a entrambe le concentrazioni saggate (50 e 100 $\mu\text{g/ml}$), la morfologia della cellula è risultata alterata, con modificazioni della membrana e riduzione del volume cellulare. In presenza di 50 $\mu\text{g/ml}$ di peptide è stato possibile evidenziare rottura della membrana nucleare e della membrana cellulare (**Figura 28, A**), distacco del plasmalemma, condensazione della cromatina e perdita dell'integrità dei mitocondri (**Figura 28, B**). Inoltre è stata osservata una riduzione del numero dei granuli densi, aumentata vacuolizzazione citoplasmatica e sfocatura del conoide.

In presenza di 100 $\mu\text{g/ml}$ di KP invece, è stata osservata la perdita dell'integrità strutturale nella maggior parte dei tachizoiti; è stata evidenziata l'alterazione del complesso interno della

membrana con spargimento di materiale cellulare nello spazio sottostante il plasmalemma distaccato prima della completa rottura delle membrane (**Figura 29**).

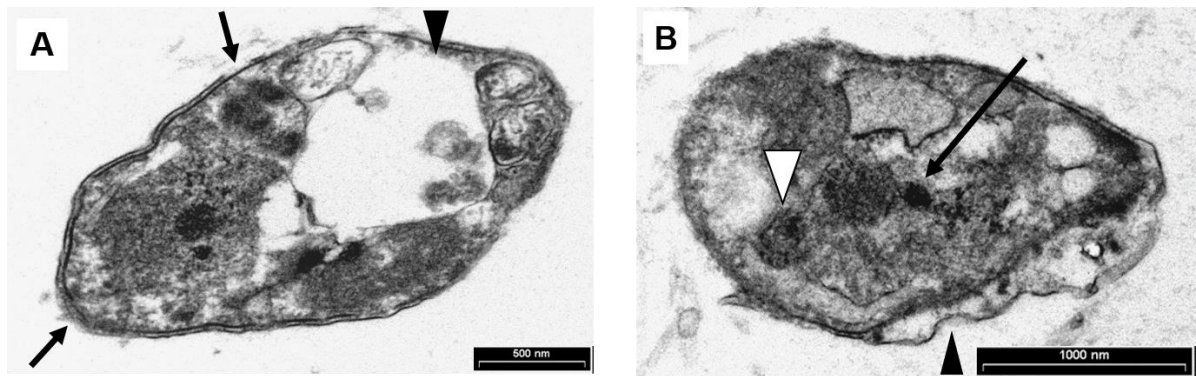


Figura 28. Alterazioni dell'ultrastruttura di tachizoiti di *T. gondii* dopo trattamento con KP. Le immagini al microscopio elettronico a trasmissione sono state ottenute dopo 3 ore di incubazione in presenza di 50 µg/ml di KP. **(A)** Rottura della membrana nucleare (punta di freccia) e della membrana cellulare (freccie nere); **(B)** distacco del plasmalemma (punta di freccia nera), condensazione della cromatina (freccia nera), disorganizzazione mitocondriale (punta di freccia bianca).

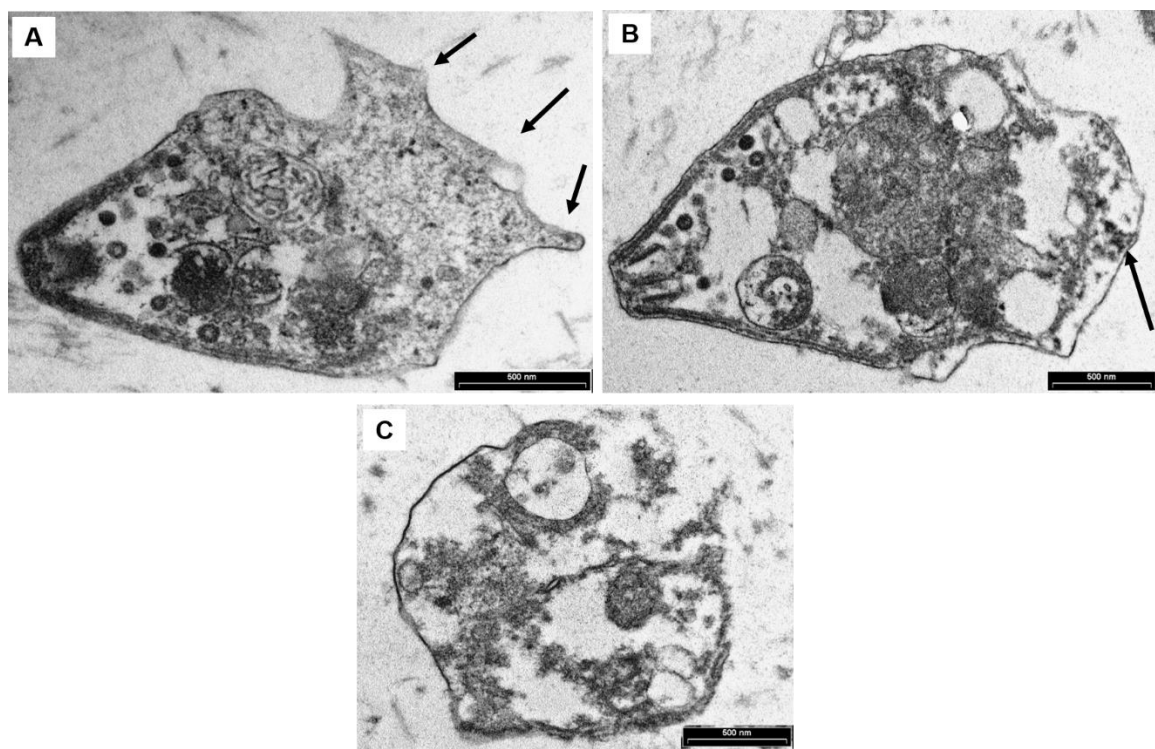


Figura 29. Alterazioni dell'ultrastruttura di tachizoiti di *T. gondii* dopo trattamento con KP. Le immagini al microscopio elettronico a trasmissione sono state ottenute dopo 3 ore di incubazione in presenza di 100 µg/ml di KP. **(A)** Protrusioni del plasmalemma contenenti materiale amorfo; **(B)**, rilascio di materiale cellulare nello spazio interno alla membrana distaccata; **(C)**, lisi cellulare.

Attività di KP e dei peptidi da esso derivati nei confronti di *Plasmodium falciparum*

Effetto dei peptidi sulla vitalità di forme asessuate di *P. falciparum*

Il saggio di attività della pLDH è stato utilizzato per la valutazione della vitalità dei due ceppi di *P. falciparum* D10 (cloroquina-sensibile) e W2 (cloroquina-resistente) in presenza di concentrazioni scalari, da 200 a 3,125 µg/ml, dei peptidi KP, K10S, K10S-I, K10S-SS, K10T-TT e R10S-RR. I valori di EC₅₀ ottenuti per ogni peptide nei confronti dei due ceppi sono riportati in **Tabella 3**. KP ha mostrato una EC₅₀ comparabile (23 e 25 µg/ml, rispettivamente) nei confronti dei due ceppi D10 e W2, mentre tutti gli altri peptidi sono risultati meno attivi.

Tabella 3. Attività dei peptidi investigati nei confronti di forme asessuate di *P. falciparum*.

Peptide	EC ₅₀ (µg/ml)* vs	
	<i>P. falciparum</i> D10	<i>P. falciparum</i> W2
KP	23 ± 5	25 ± 8
K10S	96 ± 4	110 ± 1
K10S-I	36 ± 1	50 ± 1
K10S-SS	121 ± 29	>200
K10T-TT	45 ± 19	54 ± 22
R10S-RR	70 ± 14	86 ± 16

* media ± deviazione standard dei valori ottenuti in due esperimenti indipendenti

Effetto dei peptidi sulla vitalità di gametociti di *P. falciparum*

Il saggio della luciferasi è stato utilizzato per la valutazione della vitalità dell'attività di gametociti ottenuti dal ceppo di *P. falciparum* 3D7 *elo1-pfs16*-CBG99 transgenico (cloroquina-sensibile) che esprime la luciferasi CBG99 sotto la regolazione del promotore del gene *pfs16* gametocita-specifico, in presenza di diverse concentrazioni dei peptidi KP, K10S, K10S-I, K10S-SS, K10T-TT e R10S-RR. I risultati hanno evidenziato che nessun peptide, compreso KP, possiede una significativa attività, nemmeno alla massima concentrazione

saggiata di 200 µg/ml (valori di EC₅₀ > 200).

Attività di KP e dei peptidi da esso derivati nei confronti di *L. infantum* e *L. tropica*

Effetto dei peptidi sulla vitalità di promastigoti di *L. infantum* e *L. tropica*

Il saggio colorimetrico con MTT è stato utilizzato per la valutazione della vitalità di promastigoti di *L. infantum* e *L. tropica* in presenza di concentrazioni scalari, da 200 a 3,125 µg/ml, dei peptidi KP, K10S, K10S-I, K10S-SS, K10T-TT e R10S-RR.

Il ceppo di *L. tropica* è risultato maggiormente sensibile a tutti i peptidi, fatta eccezione per K10S-SS che non è risultato attivo a nessuna delle concentrazioni saggate. KP si è dimostrato il peptide più attivo, con EC₅₀ pari a 16 e 27 µg/ml, rispettivamente, nei confronti di *L. tropica* e *L. infantum* (Tabella 4).

Tabella 4. Attività dei peptidi investigati nei confronti di promastigoti di *Leishmania* spp.

Peptide	EC ₅₀ (µg/ml)* vs	
	Promastigoti di <i>L. infantum</i>	Promastigoti di <i>L. tropica</i>
KP	27 ± 11	16 ± 6
K10S	83 ± 54	50 ± 26
K10S-I	53 ± 19	32 ± 9
K10S-SS	>200	>200
K10T-TT	47 ± 7	34 ± 12
R10S-RR	131 ± 50	84 ± 28

* media ± deviazione standard dei valori ottenuti in tre esperimenti indipendenti

Tossicità dei peptidi nei confronti di cellule THP-1

Il saggio colorimetrico con MTT è stato utilizzato per la valutazione della citotossicità dei peptidi KP, K10S, K10S-I, K10T-TT e R10S-RR, a diverse concentrazioni, nei confronti di cellule THP-1 in coltura. I risultati del saggio hanno evidenziato una non trascurabile riduzione della vitalità cellulare in presenza dei peptidi rispetto a cellule di controllo coltivate in terreno privo di peptidi (**Tabella 5**).

Tabella 5. Attività citotossica dei peptidi investigati nei confronti di cellule THP-1.

Peptide	Riduzione della vitalità cellulare*				
	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml
KP	40%	22%	15%	7%	10%
K10S	50%	41%	25%	24%	22%
K10S-I	72%	21%	13%	15%	14%
K10T-TT	20%	20%	20%	10%	11%
R10S-RR	22%	24%	24%	19%	16%

* riduzione percentuale in presenza di diverse concentrazioni di peptide rispetto alla vitalità di cellule in assenza di peptide

Effetto dei peptidi sull'infettività di *L. infantum*

Saggi preliminari per la valutazione della capacità di KP e di quattro peptidi da esso derivati, K10S, K10S-I, K10T-TT e R10S-RR, alla concentrazione di 200 µg/ml, di inibire l'infettività di *L. infantum* in cellule THP-1 hanno evidenziato una buona percentuale di inibizione dell'indice di infezione (dati non riportati).

Gli stessi peptidi sono stati rivalutati alla concentrazione di 50 µg/ml in un secondo saggio, i cui risultati sono mostrati in **Tabella 6**.

K10S-I è risultato il peptide con maggiore attività, portando ad una riduzione del 55% delle cellule infettate rispetto al controllo in assenza di peptide.

In **Figura 30** sono mostrate alcune immagini rappresentative dei preparati esaminati in microscopia ottica.

Tabella 6. Attività di inibizione dell'infettività di *L. infantum* in cellule THP-1 dei peptidi investigati.

	Peptidi (50 µg/ml)				
	KP	K10S	K10S-I	K10T-TT	R10S-RR
% di inibizione di infezione	28%	41%	55%	29%	27%

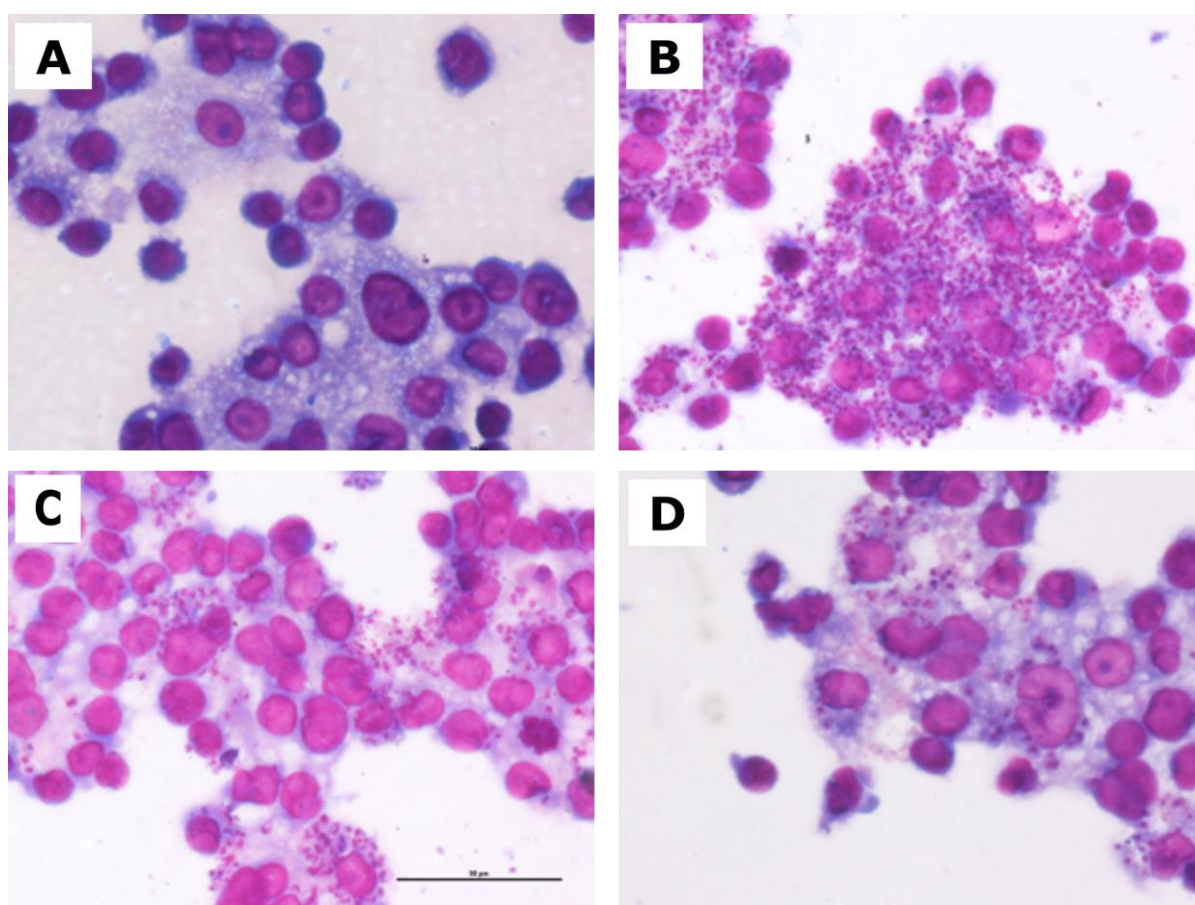


Figura 30. Microscopia ottica (40×) di cellule THP-1 in coltura infettate con *L. infantum* in assenza e presenza di peptidi. Cellule THP-1 non infettate (A); cellule THP-1 infettate con *L. infantum* (B); cellule THP-1 infettate con *L. infantum* trattate con KP alla concentrazione di 50 µg/ml (C); cellule THP-1 infettate con *L. infantum* trattate con K10S alla concentrazione di 50 µg/ml (D).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il progetto di Dottorato è stato focalizzato alla valutazione dell'attività di peptidi di derivazione anticorpale nei confronti di protozoi di interesse medico, *T. gondii*, *P. falciparum*, *L. infantum* e *L. tropica*.

I protozoi oggetto di questo studio rappresentano a tutt'oggi una problema sanitario a livello mondiale, dal momento che infettano milioni di persone e possono causare malattie di notevole gravità.

Solitamente le infezioni da protozoi vengono associate a povertà e si ritiene che siano per lo più confinate in Paesi in cui sussistono problematiche di scarsa igiene e inadeguati servizi medici. In realtà le stesse malattie possono essere presenti anche in Paesi industrializzati, a causa soprattutto dall'aumento della mobilità della popolazione, sia di viaggiatori internazionali, sia di flussi migratori provenienti da aree endemiche, ma anche di fattori ambientali ed ecologici come urbanizzazione, deforestazione e cambiamenti climatici che possono influenzare la diffusione dei vettori.

Per quanto siano attualmente disponibili farmaci per la terapia di toxoplasmosi, malaria e leishmaniosi, questi possono presentare diverse problematiche, tra cui efficacia non sempre ottimale, frequente comparsa di effetti avversi e possibile insorgenza di fenomeni di resistenza.

In questo contesto si pone lo scopo del progetto di Dottorato: indagare l'attività di peptidi di derivazione anticorpale come possibili candidati quali agenti terapeutici alternativi o da affiancare ai farmaci tradizionali nei confronti di questi protozoi.

È stata primariamente indagata l'attività di KP, un decapeptide sintetico derivato dalla sequenza della regione variabile di un Ab antiidiotipico ricombinante microbica, che agisce come immagine interna funzionale di una tossina killer di lievito ad ampio spettro d'azione antimicrobica.

E' stata precedentemente dimostrata l'assenza di tossicità di KP *in vitro* nei confronti di diverse linee cellulari in coltura, eritrociti e cellule mononucleate di sangue periferico umano [69] e la sua capacità di esplicare, mediante diversi meccanismi d'azione, attività *in vitro*, *ex vivo* e/o *in vivo* nei confronti di agenti patogeni filogeneticamente diversi, batteri, funghi, virus [69] ed anche protozoi, come *L. major*, *L. infantum* e *A. castellanii* [64,65].

In questo studio è stata valutata primariamente l'attività *in vitro* di KP in modelli cellulari di infezione da tachizoiti di *T. gondii*.

Dopo aver accertato l'assenza di tossicità di KP nei confronti delle cellule Vero utilizzate per l'infezione con il protozoo, osservazioni al microscopio hanno dimostrato che il peptide, somministrato al momento dell'infezione, è in grado di esercitare un effetto diretto nei confronti di tachizoiti extracellulari, riducendo significativamente sia il numero di parassiti in grado di invadere le cellule ospiti, sia la loro capacità di replicarsi. Tale risultato è stato confermato anche dalla quantificazione del DNA parassitario mediante real-time qPCR.

In studi precedenti sono stati descritti come possibili bersagli di KP, anche in protozoi, recettori β -glucanici espressi sulla superficie cellulare [64,69], che sono stati identificati sulla membrana delle oocisti di *T. gondii*, ma non nei tachizoiti [113].

Al fine di indagare il meccanismo d'azione esplicato dal peptide nei confronti dei tachizoiti extracellulari, sono stati condotti saggi di citofluorimetria a flusso, utilizzando come marcatori Annexina-V e 7-AAD, per poter valutare la possibile esternalizzazione di fosfatidilserina e l'integrità strutturale di membrana nei parassiti, due noti indicatori di apoptosi, rispettivamente precoce e tardiva.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che, a seguito del trattamento con KP, si verifica un significativo incremento della traslocazione di fosfatidilserina dalla membrana citoplasmatica interna a quella esterna. In particolare il fenomeno è risultato essere rapido e dose-dipendente, ma non dipendente da un più prolungato periodo di incubazione dei parassiti con il peptide, infatti aumentando il tempo di trattamento con KP le cellule in apoptosi precoce non sono aumentate e la maggior parte sono risultate 7-AAD negative.

L'esternalizzazione di fosfatidilserina è un evento generalmente indicativo dell'induzione di apoptosi precoce in diversi tipi di cellule, incluse quelle di protozoi [114]. Tuttavia, in *T. gondii* e *Leishmania*, l'esposizione di fosfatidilserina sulla porzione esterna della membrana è stata associata anche a un meccanismo conservato di adattamento per l'evasione della risposta immune di macrofagi attivati. Tale fenomeno avviene sia in protozoi parassiti endocellulari, sia in cellule tumorali in grado di mimare la risposta antiinfiammatoria indotta da cellule apoptotiche [115-119].

Per confermare quindi che l'esposizione di fosfatidilserina da parte di *T. gondii* indotta da KP sia effettivamente un indicatore precoce di morte cellulare per apoptosi, sono stati condotti studi per valutare l'induzione da parte di KP di altri riconosciuti indicatori apoptotici in tachizoiti, come la variazione del potenziale di membrana mitocondriale e la frammentazione del DNA genomico [114,120].

Poiché è noto che la sonda potenziometrica TMRM è in grado di rilevare cambiamenti nel potenziale di membrana mitocondriale in alcuni protozoi parassiti, come *L. infantum* [121] e

Trypanosoma brucei [122,123], la stessa sonda è stata utilizzata in microscopia confocale per determinare possibili variazioni del $\Delta\Psi_m$ di tachizoiti extracellulari di *T. gondii* in seguito al trattamento con KP.

Un saggio preliminare condotto con FCCP ha permesso di confermare la capacità di TMRM di legarsi specificamente ai mitocondri dei tachizoiti. Infatti 4 minuti dopo l'aggiunta del disaccoppiante alle cellule marcate è stato possibile osservare una effettiva perdita del $\Delta\Psi_m$.

È stato quindi osservato che, rispetto a tachizoiti di controllo, il cui $\Delta\Psi_m$ risulta rimanere inalterato nel tempo, il trattamento con KP è in grado di determinare una riduzione della capacità di caricamento della TMRM, indicativo di perdita di $\Delta\Psi_m$, in maniera tempo e dose-dipendente. Sono stati infatti osservati, già dopo 10 minuti dall'aggiunta ai tachizoiti di KP a 50 $\mu\text{g/ml}$, una significativa riduzione del $\Delta\Psi_m$, e un suo collasso totale dopo 15 minuti dall'aggiunta di una concentrazione doppia di peptide.

Tale risultato, unitamente ai dati emersi utilizzando Annessina-V e 7-AAD, suggerisce che i tachizoiti, in presenza di KP, vadano incontro a un rapido calo del $\Delta\Psi_m$, pur mantenendo una certa integrità strutturale di membrana, come avviene in cellule apoptotiche [124].

Un altro evento che solitamente si verifica durante i processi apoptotici è la frammentazione del DNA genomico [125]. Mediante studi in citofluorimetria a flusso utilizzando il saggio TUNEL è stato possibile rilevare un aumento di DNA frammentato dopo trattamento dei parassiti con KP a 50 $\mu\text{g/ml}$ per 24 e 48 ore rispetto a tachizoiti di controllo. Si tratta dunque di un fenomeno tardivo e tempo-dipendente. Il trattamento con una dose superiore di peptide non ha mostrato invece significativi aumenti nella quantità di frammenti genomici, presumibilmente a causa di una già troppo avanzata frammentazione del DNA, non più rilevabile con la sonda.

La morfologia dei parassiti è stata esaminata mediante TEM. I tachizoiti sono apparsi di tipica forma a semiluna, con un polo anteriore appuntito, rispetto al polo basale più arrotondato. In presenza di KP a concentrazioni crescenti sono state riscontrate alterazioni progressive della morfologia cellulare, a partire da fenomeni tipici di apoptosi precoce, quali distacco del plasmalemma, rottura della membrana nucleare, condensazione della cromatina, alterazione morfologica mitocondriale, fino al versamento di materiale amorfo al di fuori della cellula, e, infine, lisi cellulare totale.

Complessivamente, i risultati ottenuti indicano dunque la capacità di KP di indurre morte cellulare per apoptosi in tachizoiti di *T. gondii*.

Il peptide killer potrebbe così rappresentare una nuova promettente alternativa per la messa a punto di agenti anti-*Toxoplasma*.

Parallelamente, sono stati condotti saggi *in vitro* per la valutazione dell'attività di KP e di cinque peptidi da esso derivati (K10S, K10S-I, K10S-SS, K10T-TT e R10S-RR) nei confronti di forme asessuate di due ceppi di *P. falciparum*, uno sensibile e uno resistente a cloroquina, e di forme sessuate di un ceppo di *P. falciparum* ricombinante, cloroquina- sensibile, di promastigoti di *L. infantum* e *L. tropica* e di amastigoti di *L. infantum*.

Tutti i peptidi, fatta eccezione per K10S-SS, hanno mostrato attività antimicrobica nei confronti delle forme asessuate di *P. falciparum*. KP è risultato il peptide maggiormente attivo, mostrandosi ugualmente efficace nei confronti sia del ceppo sensibile sia del ceppo resistente a cloroquina. Nessuno dei peptidi saggiati ha mostrato attività di inibizione della proliferazione di gametociti di *P. falciparum*.

In accordo con quanto riportato in precedenti esperimenti condotti su ceppi di *L. major* e *L. infantum* [64], KP ha mostrato una significativa attività *in vitro* nei confronti di promastigoti di *L. infantum* e *L. tropica*. I peptidi K10S, K10S-I, K10T-TT e R10S-RR hanno mostrato attività nei confronti di forme extracellulari degli stessi ceppi di *Leishmania*, anche se inferiore a quella di KP. Saranno necessari ulteriori studi per identificare il possibile meccanismo d'azione dei diversi peptidi nei confronti dei promastigoti di *Leishmania*.

Esperimenti preliminari di inibizione dell'infettività di *L. infantum* in cellule THP-1, differenziate in macrofagi, hanno mostrato una buona capacità di tutti i peptidi saggiati di ridurre il numero di cellule infettate. In questi saggi, l'attività dei peptidi K10S, K10S-I e K10T-TT è risultata maggiore rispetto a quella del peptide parentale KP.

La valutazione del potenziale effetto tossico *in vitro* degli stessi peptidi nei confronti della linea cellulare utilizzata per l'infezione ha tuttavia evidenziato una loro non trascurabile citotossicità. Per confermare i dati preliminari ottenuti di inibizione dell'infettività saranno necessari ulteriori studi in cui KP e i peptidi da esso derivati verranno saggiati nel modello di infezione di *Leishmania* in cellule U937, una linea cellulare di precursori di monociti derivati da cellule maligne di linfoma umano, in cui è già stata verificata l'assenza di tossicità da parte dei peptidi oggetto dello studio.

In conclusione, peptidi derivati da Ab, dimostratisi attivi *in vitro* nei confronti di diversi protozoi di interesse medico, potrebbero rappresentare, grazie anche alla facilità di produzione e manipolazione, una promettente alternativa a farmaci attualmente in uso per la terapia delle malattie causate da questi agenti eziologici.

BIBLIOGRAFIA

1. Adegoke A.A, Faleye A.C., Singh G., Stenström T.A. Antibiotic resistant superbugs: assessment of the interrelationship of occurrence in clinical settings and environmental niches. *Molecules* 2016; 22:E29.
2. Khan S.N., Khan A.U. Breaking the spell: combating multidrug resistant 'superbugs'. *Front Microbiol.* 2016; 7:174.
3. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013; 11:297-308.
4. Kosikowska P., Lesner A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015). *Expert Opin Ther Pat.* 2016; 26:689-702. doi:10.1080/13543776.2016.1176149.
5. Hancock R.E.W., Nijnik A., Philpott D.J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol.* 2012; 10:243-54.
6. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449:819-26.
7. Kumar H., Kawai T., Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2009; 30:16-34.
8. Bowdish D.M.E., Davidson D.J., Hancock R.E.W. A re-evaluation of a role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci.* 2005; 6:35-51.
9. Diamond G., Beckloff N., Weinberg A., Kisich K.O. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des.* 2009; 15:2377-92.
10. Hancock R.E.W., Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 2000; 8:402-10.
11. Xia X., Cheng L., Zhang S., Wang L., Hu J. The role of natural antimicrobial peptides during infection and chronic inflammation. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2017; doi:10.1007/s10482-017-0929-0.
12. Mahlapuu M., Håkansson J., Ringstad L., Björn C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6:194. doi:10.3389/fcimb.2016.00194.
13. Wang G., Li X., Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(D1), D1087-93.
14. Yeaman M.R., Yount N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2003; 55:27-55.
15. Hancock R.E.W., Sahl H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006; 24:1551-7.
16. Pasupuleti M., Schmidtchen A., Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol.* 2012; 32:143-71. doi: 10.3109/07388551.2011.594423.

17. Takahashi D., Shukla S.K., Prakash O., Zhang G. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie* 2010; 92:1236-41. doi: 10.1016/j.biochi.2010.02.023.
18. Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 2011; 464-72.
19. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3:238-50.
20. Khurshid Z., Naseem M., Sheikh Z., Najeeb S., Shahab S., Zafar M.S. Oral antimicrobial peptides: types and role in the oral cavity. *Saudi Pharm J.* 2016; 24:515-24.
21. Hale J.D., Hancock R.E.W. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5:951-9.
22. Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J.* 2009; 276:6483-96. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07359.x.
23. Manabe T., Kawasaki K. D-form KLKLLLLLKLK-NH₂ peptide exerts higher antimicrobial properties than its L-form counterpart via an association with bacterial cell wall components. *Sci Rep.* 2017; 7:43384. doi: 10.1038/srep43384.
24. Ando K., Natori S. Inhibitory effect of sarcotoxin IIA, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*. *J Biochem.* 1988; 103:735-9.
25. Chesnokova L.S., Slepnev S.V., Witt S.N. The insect antimicrobial peptide, L-pyrrothocoricin, binds to and stimulates the ATPase activity of both *wild-type* and *lidless* DnaK. *FEBS Lett.* 2004; 565:65-9.
26. Robert É., Lefèvre T., Fillion M., Martial B., Dionne J., Auger M. Mimicking and understanding the agglutination effect of the antimicrobial peptide Thanatin using model phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 2015; 54:3932-41. doi:10.1021/acs.biochem.5b00442.
27. Hong R.W., Shchepetov M., Weiser J.N., Axelsen P.H. Transcriptional profile of the *Escherichia coli* response to the antimicrobial insect peptide cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:1-6..
28. Magliani W., Giovati L., Ciociola T., Sperindè M., Santinoli C., Conti G., Conti S., Polonelli L. Antibodies as a source of anti-infective peptides: an update. *Future Microbiol.* 2015; 10:1163-75. doi:10.2217/fmb.15.36
29. Dimitrov D.S., Marks J.D. Therapeutic antibodies: current state and future trends - is a paradigm change coming soon? *Methods Mo. Biol.* 2009; 525:1-27.
30. Nelson A.L., Dhimolea E., Reichert J.M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9:767-74.
31. Beck A., Wurch T., Bailly C., Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:345-52.
32. Bevan E.A., Makower M. The physiological basis of the killer character in yeast. In: Proceedings of the 11th International Congress on Genetics. 1963; 1:202-203.

33. Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10:369-400.
34. Schmitt M.J., Breinig F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4:212-21.
35. Buzzini P., Turchetti B., Vaughan-Martini A.E. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Res.* 2007; 7: 749-60.
36. Pettoello-Mantovani M., Nocerino A., Polonelli L., Morace G., Conti S., di Martino L., De Ritis G., Iafusco M., Guandalini S. et al. *Hansenula anomala* killer toxin induces secretion and severe acute injury in the rat intestine. *Gastroenterology* 1995; 109:1900-6.
37. Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Inst Pasteur)* 1974; 125C:373.
38. Magliani W., Conti S., Travassos L.R., Polonelli L. From yeast killer toxins to antibiobodies and beyond. *FEMS Microbiol Lett.* 2008; 288:1-8.
39. Selvakumar D., Miyamoto M., Furuichi Y., Komiyama T. Inhibition of fungal beta-1,3-glucan synthase and cell growth by HM-1 killer toxin single-chain anti-idiotypic antibodies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:3090-7.
40. Krishnaswamy S., Kabir M.E., Miyamoto M., Furuichi Y., Komiyama T. Different buffer effects in selecting HM-1 killer toxin single-chain fragment variable anti-idiotypic antibodies. *J Biochem.* 2010; 147:723-33.
41. Magliani W., Conti S., Frazzi R., Ravanetti L., Maffei D.L, Polonelli L. Protective antifungal yeast killer toxin-like antibodies. *Curr Mol Med.* 2005; 5:443-52.
42. Polonelli L., Lorenzini R., De Bernardis F., Gerloni M., Conti S., Morace G., Magliani W., Chezzi C. Idiotypic vaccination: Immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. *Scand J Immunol.* 1993; 37:105-10.
43. Polonelli L., De Bernardis F., Conti S., Boccanera M., Gerloni M., Morace G., Magliani W., Chezzi C., Cassone C. Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like antiidiotypic antibodies. *J Immunol.* 1994; 152:3175-82.
44. Polonelli L., De Bernardis F., Conti S., Boccanera M., Magliani W., Gerloni M., Cantelli C., Cassone A. Human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies. *J Immunol.* 1996; 156:1880-5.
45. Polonelli L., Magliani W., Ciociola T., Giovati L., Conti S. From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011; 99:35-41.
46. Magliani W., Conti S., Giovati L., Maffei D.L., Polonelli L. Anti-beta-glucan-like immunoprotective candidacidal antiidiotypic antibodies. *Front Biosci.* 2008; 13:6920-37.
47. Bromuro C., Torosantucci A., Chiani P., Conti S., Polonelli L., Cassone A. Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine. *Infect Immun.* 2002; 70:5462-70.

48. Torosantucci A., Bromuro C., Chiani P., De Bernardis F., Berti F., Galli C., Norelli F., Bellucci C., Polonelli L., Costantino P., Rappuoli R., Cassone A. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med*. 2005; 202:597-606.
49. Rachini A., Pietrella D., Lupo P., Torosantucci A., Chiani P., Bromuro C., Proietti C., Bistoni F., Cassone A., Vecchiarelli A. An anti-beta-glucan monoclonal antibody inhibits growth and capsule formation of *Cryptococcus neoformans* *in vitro* and exerts therapeutic, anticryptococcal activity *in vivo*. *Infect Immun*. 2007; 75:5085-94.
50. Capodicasa C., Chiani P., Bromuro C., De Bernardis F., Catellani M., Palma A.S., Liu Y., Feizi T., Cassone A., Benvenuto E., Torosantucci A. Plant production of anti- β -glucan antibodies for immunotherapy of fungal infections in humans. *Plant Biotechnol J*. 2011; 9:776-87.
51. Holliger P., Hudson P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*. 2005; 23:1126-36.
52. Saerens D., Ghassabeh G.H., Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8:600-8.
53. Chen W., Zhu Z., Feng Y., Dimitrov D.S. Human domain antibodies to conserved sterically restricted regions on gp120 as exceptionally potent cross-reactive HIV-1 neutralizers. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105:17121-6.
54. Wesolowski J., Alzogaray V., Reyelt J., Unger M., Juarez K., Urrutia M., Cauerhff A., Danquah W., Rissiek B., Scheuplein F., Schwarz N., Adriouch S., Boyer O., Seman M., Licea A., Serreze D.V., Goldbaum F.A., Haag F., Koch-Nolte F. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*. 2009; 198:157-74.
55. Chen W., Zhu Z., Feng Y., Dimitrov D.S. A large human domain antibody library combining heavy and light chain CDR3 diversity. *Mol Immunol*. 2010; 47:912-21.
56. Bourgeois C., Bour J.B., Aho L.S., Pothier P. Prophylactic administration of a complementarity-determining region derived from a neutralizing monoclonal antibody is effective against respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice. *J Virol*. 1998; 72:807-10.
57. Heap C.J., Wang Y., Pinheiro T.J., Reading S.A., Jennings K.R., Dimmock N.J. Analysis of a 17-amino acid residue, virus-neutralizing microantibody. *J Gen Virol*. 2005; 86:1791-800.
58. Polonelli L., Magliani W., Conti S., Bracci L., Lozzi L., Neri P., Adriani D., De Bernardis F., Cassone A. Therapeutic activity of an engineered synthetic killer antiidiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis. *Infect Immun*. 2003; 71:6205-12.
59. Manfredi M., McCullough M.J., Conti S., Polonelli L., Vescovi P., Al-karaawi Z.M., Porter S.R. *In vitro* activity of a monoclonal killer antiidiotypic antibody and a synthetic killer peptide against oral isolates of *Candida* spp. differently susceptible to conventional antifungals. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20:226-32.

60. Cenci E., Bistoni F., Mencacci A., Perito S., Magliani W., Conti S., Polonelli L., Vecchiarelli A. A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. *Cell Microbiol.* 2004; 6:953-61.
61. Travassos L.R., Silva L.S., Rodrigues E.G., Conti S., Salati A., Magliani W., Polonelli L. Therapeutic activity of a killer peptide against experimental paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54:956-58.
62. Magliani W., Conti S., Maffei D.L., Ravanetti L., Polonelli L. Antiidiotypic-derived killer peptides as new potential tools to combat HIV-1 and AIDS-related opportunistic pathogens. *Antifungal Agents Med Chem.* 2007; 6:263-72.
63. Donini M., Lico C., Baschieri S., Conti S., Magliani W., Polonelli L., Benvenuto E. Production of an engineered killer peptide in *Nicotiana benthamiana* by using a *Potato virus X* expression system. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 6360-7.
64. Savoia D., Scutera S., Raimondo S., Conti S., Magliani W., Polonelli L. Activity of an engineered synthetic killer peptide on *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. *Exp Parasitol.* 2006; 113:186-92.
65. Fiori P.L., Mattana A., Dessì D., Conti S., Magliani W., Polonelli L. In vitro acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57:891-8.
66. Casoli C., Pilotti E., Perno C.F., Balestra E., Polverini E., Cassone A., Conti S., Magliani W., Polonelli L. A killer mimotope with therapeutic activity against AIDS-related opportunistic microorganisms inhibits *ex vivo* HIV-1 replication. *AIDS* 2006; 20: 975-80.
67. Conti G., Magliani W., Conti S., Nencioni L., Sgarbanti R., Palamara A.T., Polonelli L. Therapeutic activity of an anti-idiotypic antibody-derived killer peptide against influenza A virus experimental infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:4331-7.
68. Cenci E., Pericolini E., Mencacci A., Conti S., Magliani W., Bistoni F., Polonelli L., Vecchiarelli A. Modulation of phenotype and function of dendritic cells by a therapeutic synthetic killer peptide. *J Leukoc Biol.* 2006; 79:40-5.
69. Magliani W., Conti S., Ciociola T., Giovati L., Zanello P.P., Pertinhez T., Spisni A., Polonelli L. Killer peptide: a novel paradigm of antimicrobial, antiviral and immunomodulatory auto-delivering drugs. *Future Med Chem.* 2011; 3:1209-31.
70. Pertinhez T.A., Conti S., Ferrari E., Magliani W., Spisni A., Polonelli L. Reversible self-assembly: a key feature for a new class of autodelivering therapeutic peptides. *Mol Pharm.* 2009; 6:1036-39.
71. Zhang S., Holmes T., Lockshin C., Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3334-8.
72. Hauser C.A., Zhang S. Designer self-assembling peptide nanofiber biological materials. *Chem Soc Rev.* 2010; 39:2780-90.
73. Zhao X., Pan F., Xu H., Yaseen M., Shan H., Hauser C.A., Zhang S., Lu J.R. Molecular self-assembly and applications of designer peptide amphiphiles. *Chem Soc Rev.* 2010; 39:3480-98.

74. Maji S.K., Schubert D., Rivier C., Lee S., Rivier J.E., Riek R. Amyloid as a depot for the formulation of long-lasting drugs. *PLoS Biol.* 2008; 6:e17.
75. Magliani W., Conti S., Cunha R.L., Travassos L.R., Polonelli L. Antibodies as crypts of antiinfective and antitumor peptides. *Curr Med Chem.* 2009; 16:2305-23.
76. Polonelli L., Pontón J., Elguezbal N., Moragues M.D., Casoli C., Pilotti E., Ronzi P., Dobroff A.S., Rodrigues E.G., Juliano M.A., Maffei D.L, Magliani W., Conti S., Travassos L.R. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLoS One* 2008; 3:e2371.
77. Gabrielli E., Pericolini E., Cenci E., Ortelli F., Magliani W., Ciociola T., Bistoni F., Conti S., Vecchiarelli A., Polonelli L. Antibody complementarity-determining regions (CDRs): a bridge between adaptive and innate immunity. *PLoS One* 2009; 4:e8187.
78. Polonelli L., Ciociola T., Magliani W., Zanello P.P., D'Adda T., Galati S., De Bernardis F., Arancia S., Gabrielli E., Pericolini E., Vecchiarelli A., Arruda D.C., Pinto M.R., Travassos L.R., Pertinhez T.A., Spisni A., Conti S. Peptides of the constant region of antibodies display fungicidal activity. *PLoS One* 2012; 7:e34105.
79. Gabrielli E., Pericolini E., Cenci E., Monari C., Magliani W., Ciociola T., Conti S., Gatti R., Bistoni F., Polonelli L., Vecchiarelli A. Antibody constant region peptides can display immunomodulatory activity through activation of the Dectin-1 signalling pathway. *PLoS One* 2012; 7:e43972.
80. Schmidtchen A., Pasupuleti M., Mörgelin M., Davoudi M., Alenfall J., Chalupka A., Malmsten M. Boosting antimicrobial peptides by hydrophobic oligopeptide end tags. *J Biol Chem.* 2009; 284:17584-94.
81. Zhang L., Falla T.J. Host defense peptides for use as potential therapeutics. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009; 10:164-71.
82. Jenssen H., Hancock R.E.W. Therapeutic potential of HDPs as immunomodulatory agents. *Methods Mol Biol.* 2010; 618:329-47.
83. Matejuk A., Leng Q., Begum M.D., Woodle M.C., Scaria P., Chou S.T., Mixson A.J. Peptide-based antifungal therapies against emerging infections. *Drugs Future.* 2010; 35:197.
84. Theel E.S., Pritt B.S. Parasites. *Microbiol Spectr.* 2016; 4. doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0013-2015.
85. Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000; 30:1217-58.
86. Robert-Gangneux F., Dardé M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25:264-96.
87. Montoya J.G., Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004; 363:1965-76.
88. Nicolle C., Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *CR Seances Acad Sci.* 1908; 147:763-6.

89. Splendore A. Un nuovo parassita dei conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo Nota preliminare pel, *Rev Soc Sci Sao Paulo* 1908; 3:109-12.
90. Kim K., Weiss L.M. Toxoplasma: the next 100 years. *Microbes Infect.* 2008; 10:978-84. doi: 10.1016/j.micinf.2008.07.015.
91. Frenkel J.K., Dubey J.P., Miller N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 1970; 167:893-6.
92. Blader I.J., Coleman B.I., Chen C.T., Gubbels M.J. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annu Rev Microbiol.* 2015; 69:463-85.
93. Weiss L.M., Dubey J.P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol.* 2009; 39:895-901.
94. Rajapakse S., Chirshan Shivanthan M., Samaranayake N., Rodrigo C., Deepika Fernando S. Antibiotics for human toxoplasmosis: a systematic review of randomized trials. *Pathog Glob Health* 2013; 107:162-9.
95. Kaye A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care* 2011; 25:355-64.
96. Kappagoda S., Singh U., Blackburn B.G. Antiparasitic therapy. *Mayo Clin Proc.* 2011; 86:561-83.
97. Montoya J.G., Rosso F. Diagnosis and management of toxoplasmosis. *Clin Perinatol.* 2005; 32:705-26.
98. World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2016. WHO Press. Geneva, Switzerland, 2016.
99. Rossati A., Bargiacchi O., Kroumova V., Zaramella M., Caputo A., Garavelli P.L. Climate, environment and transmission of malaria. *Infez Med.* 2016; 24:93-104.
100. Josling G.A., Llinás M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13:573-87.
101. Autino B., Corbett Y., Castelli F., Taramelli D. Pathogenesis of malaria in tissues and blood. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012; 4:e2012061.
102. Mokgethi-Morule T., N'Da D.D. Cell based assays for anti-*Plasmodium* activity evaluation. *Eur J Pharm Sci.* 2016; 84:26-36.
103. Cunningham A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002; 72:132-41.
104. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect.* 2014; 69 Suppl 1:S10-8.
105. Torres-Guerrero E., Quintanilla-Cedillo M.R., Ruiz-Esmenjaud J., Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res.* 2017; 6:750.
106. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, 22–26 March 2010.

107. Barteselli A., Casagrande M., Basilico N., Parapini S., Rusconi C.M., Tonelli M., Boido V., Taramelli D., Sparatore F., Sparatore A. Clofazimine analogs with antileishmanial and antiplasmodial activity. *Bioorg Med Chem.* 2015; 23:55-65.
108. Edvinsson B., Lappalainen M., Evengard B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12:131-6.
109. Homan W.L., Vercammen M., De Braekeleer J., Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol.* 2000; 30:69-75.
110. Markwalter C.F., Davis K.M., Wright D.W. Immunomagnetic capture and colorimetric detection of malarial biomarker *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. *Anal Biochem.* 2016; 493:30-4.
111. Cevenini L., Camarda G., Michelini E., Siciliano G., Calabretta M.M, Bona R, Kumar T.R, Cara A, Branchini B.R, Fidock D.A, Roda A, Alano P. Multicolor bioluminescence boosts malaria research: quantitative dual-color assay and single-cell imaging in *Plasmodium falciparum* parasites. *Anal Chem.* 2014; 86:8814-21.
112. D'Alessandro S., Camarda G., Corbett Y., Siciliano G., Parapini S., Cevenini L., Michelini E., Roda A., Leroy D., Taramelli D., Alano P. A chemical susceptibility profile of the *Plasmodium falciparum* transmission stages by complementary cell-based gametocyte assays. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71:1148-58.
113. Bushkin G.G., Motari E., Magnelli P., Gubbels M.J., Dubey J.P., Miska K.B., Bullitt E., Costello C.E., Robbins P.W., Samuelson J. β -1,3-glucan, which can be targeted by drugs, forms a trabecular scaffold in the oocyst walls of *Toxoplasma* and *Eimeria*. *mBio.* 2012; 3:e00258-12.
114. Jiménez-Ruiz A., Alzate J.F., Macleod E.T., Lüder C.G., Fasel N., Hurd H. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* 2010; 3:104.
115. de Freitas Balanco J.M., Moreira M.E., Bonomo A., Bozza P.T., Amarante-Mendes G., Pirmez C., Barcinski M.A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol.* 2001; 11:1870-3.
116. Wanderley J.L., Moreira M.E., Benjamin A., Bonomo A.C., Barcinski M.A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol.* 2006; 176:1834-9.
117. Moreira M.E., Barcinski M.A. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. *An Acad Bras Cienc.* 2004; 76:93-115.
118. Seabra S.H., de Souza W., Damatta R.A. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 324:744-52.
119. dos Santos T.A., Portes JdA., Damasceno-Sá J.C., Caldas L.A., Souza Wd., Damatta R.A., Seabra S.H. Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. *PLoS One.* 2011; 6:e27867.

120. Ni Nyoman A.D., Lüder C.G. Apoptosis-like cell death pathways in the unicellular parasite *Toxoplasma gondii* following treatment with apoptosis inducers and chemotherapeutic agents: a proof-of-concept study. *Apoptosis* 2013; 18:664-80.
121. Alzate J.F., Barrientos A.Á., González V.M., Jiménez-Ruiz A. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-XL expression. *Apoptosis* 2006; 11:161-71.
122. Figarella K., Uzcategui N.L., Beck A., Schoenfeld C., Kubata B.K., Lang F., Duszenko M. Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. *Cell Death Differ.* 2006; 13:1802-14.
123. Figarella K., Rawer M., Uzcategui N.L., Kubata B.K., Lauber K., Madeo F., Wesselborg S., Duszenko M. Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ.* 2005; 12:335-46.
124. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009; 16:3-11.
125. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35:495-516.