



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
Facoltà di Medicina Veterinaria

**DOTTORATO DI RICERCA IN PRODUZIONI ANIMALI,
BIOTECNOLOGIE VETERINARIE, QUALITÀ E
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI**

**L'IMMUNOPATOGENESI DELLE
MALATTIE PARASSITARIE**

Coordinatore del Dottorato:
Chiar.mo Prof. Primo Mariani

Tutore:
Chiar.ma Prof.ssa Laura H. Kramer

Dottorando:
Dott. Giulio Grandi

XX CICLO

INDICE

1 – INTRODUZIONE ALLA PATOGENICITÀ E ALLE RISPOSTE IMMUNITARIE NEI CONFRONTI DEGLI ORGANISMI PARASSITARI	3
1.1 – CARATTERISTICHE DEI PARASSITI IN GRADO DI INFLUENZARE LA RISPOSTA IMMUNITARIA.	5
1.2 – RISPOSTA IMMUNITARIA NEI CONFRONTI DEGLI ORGANISMI PARASSITI.	8
1.3 – EVASIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA DA PARTE DEI PARASSITI.	12
2 – LA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA: COMPONENTI E RUOLO NELLE INFEZIONI PROTOZOARIE	14
2.1 – BARRIERE EPITELIALI.	17
2.2 – FAGOCITI: NEUTROFILI E MACROFAGI.	18
2.3 – LE CELLULE NATURAL KILLER (NK).	27
2.4 – IL SISTEMA COMPLEMENTO.	30
2.5 – LE CELLULE DENDRITICHE (DC).	31
2.6 – LE CITOCINE CHE MEDIANO E REGOLANO LA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA.	37
3 - CICLO BIOLOGICO, PATOGENICITÀ E RISPOSTA IMMUNITARIA A <i>NEOSPORA CANINUM</i>	40
3.1 – IL PARASSITA.	40
3.2 – CICLO BIOLOGICO.	41
3.3 – PATOGENESI.	43
3.4 – LA RISPOSTA IMMUNITARIA NELLA NEOSPOROSI.	45
3.5 – LE CELLULE DENDRITICHE E <i>TOXOPLASMA GONDII</i>.	54
4 – CICLO BIOLOGICO, PATOGENICITÀ E RISPOSTA IMMUNITARIA A <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	59
4.1 – IL PARASSITA.	59
4.2 – IL VETTORE BIOLOGICO.	60
4.3 – CICLO BIOLOGICO	62
4.4 – PATOGENESI.	65
4.5 – LA RISPOSTA IMMUNITARIA NELLA LEISHMANIOSI VISCERALE CANINA.	69
4.6 – LE CELLULE DENDRITICHE E <i>LEISHMANIA</i>.	73
5 – PARTE SPERIMENTALE.	77
5.1 – LA LINEA CELLULARE DH82 COME MODELLO DI CELLULA ISTIOCITARIA.	77
INTRODUZIONE	77
5.1.1 – VALUTAZIONE DELL’ESPRESSIONE DI MARKERS IMMUNOLOGICI DELLA LINEA CELLULARE DH82.	78
MATERIALI E METODI	79
RISULTATI	82

5.1.2 – INFEZIONE DELLE CELLULE DH82 CON <i>N. CANINUM</i> E OSSERVAZIONE DELLE ALTERAZIONI MORFOLOGICHE E DI ESPRESSIONE DI MARKERS IMMUNOLOGICI.	90
MATERIALI E METODI	90
RISULTATI	94
DISCUSSIONE	102
5.2 – GENERAZIONE E INFEZIONE DI CELLULE DENDRITICHE DEL BOVINO CON <i>NEOSPORA CANINUM</i> E DI CANE CON <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>.	105
5.2.1 – GENERAZIONE DI DC BOVINE MEDIANTE L'IMPIEGO DEL TCCM E LORO INFEZIONE CON <i>NEOSPORA CANINUM</i>.	105
MATERIALI E METODI	106
RISULTATI	112
5.2.2 – GENERAZIONE DI DC DI CANE CON CITOCHINE RICOMBINANTI E LORO INFEZIONE CON <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>.	117
MATERIALI E METODI	117
RISULTATI	120
DISCUSSIONE	122
RINGRAZIAMENTI	124
BIBLIOGRAFIA	125

1 – INTRODUZIONE ALLA PATOGENICITÀ E ALLE RISPOSTE IMMUNITARIE NEI CONFRONTI DEGLI ORGANISMI PARASSITARI

Il parassitismo è una delle possibili associazioni simbiotiche che si ritrovano in natura, insieme al commensalismo (uno degli organismi simbiotici trae vantaggio dall'altro senza causargli danno) e alla simbiosi mutualistica (entrambe le specie simbiotiche traggono vantaggio dalla simbiosi). A differenza delle ultime due, il parassitismo è caratterizzato dal rapporto antagonista che si instaura tra il parassita e l'ospite, il quale fornisce i mezzi di sussistenza al parassita a suo danno. In base a queste definizioni, la distinzione tra parassiti e commensali viene effettuata in funzione della patogenicità (intesa come capacità di una specie simbiotica di danneggiare una specie ospite). Spesso non esiste una netta separazione tra le due situazioni, poiché il potenziale patogeno di un parassita può richiedere particolari alterazioni dell'ospite, quali ad esempio carenze nutrizionali, lesioni di continuità delle barriere fisiche o ancora una compromissione del sistema immunitario.

In sintesi, l'azione patogena dei parassiti si può spiegare attraverso azioni traumatiche, meccaniche, necrotizzanti, tossiche, immunologiche e spogliatrici, spesso in associazione tra di loro. Le azioni traumatiche sono tipiche di tutti gli ectoparassiti e di alcune larve/adulti di elminti (ad esempio, la perforazione intestinale causata dagli ascaridi o il danno di diversi tessuti provocato dalla migrazione delle microfilarie di diverse specie di filaridi, umani e animali). Le azioni meccaniche, dipendenti da grandezza e numerosità dei parassiti, si possono presentare a diversi livelli, macroscopico (ad esempio, l'ostruzione intestinale causata dagli ascaridi, o la compressione di organi vitali che si verifica nelle infestazioni da metacestodi – *Echinococcus* spp. e *Taenia* spp.) o microscopico (ad esempio, l'ostruzione dei capillari cerebrali causata dall'adesione endoteliale degli eritrociti parassitati nel caso della malaria). Le azioni necrotizzanti possono essere o diretta conseguenza dell'azione traumatica (ad esempio l'azione di *Fasciola hepatica* a livello di fegato e vie biliari), o eventi dovuti alla secrezione di enzimi proteolitici da parte del parassita o ancora, nel caso dei protozoi intracellulari come *Neospora*, *Leishmania* e *Toxoplasma*, conseguenza della lisi

cellulare che avviene al termine del ciclo litico di replicazione. Le azioni tossiche sono spesso presenti come conseguenze dell'inoculo da parte di ectoparassiti di sostanze tossiche o come risposta ai cataboliti (tossici) dei parassiti in generale. L'azione spogliatrice, spiccata in molte elmintosi (numerosi elminti gastrointestinali sottraggono direttamente i fluidi organici dell'ospite o causano direttamente malassorbimento e perdita di proteine plasmatiche) è presente anche come effetto globale di altre parassitosi: si pensi al caso della malaria, in cui ogni accesso febbrile costa all'organismo circa 5000 kilocalorie, pari ai pasti di 3 giorni di un individuo che vive in un paese in via di sviluppo (Sacchi L. et al., 2004). Più complesse sono invece le azioni dei parassiti sul sistema immunitario; i parassiti infatti tentano di evadere la risposta immunitaria o impiegano, per la loro esistenza, strutture del sistema immunitario stesso (come ad esempio avviene nell'interazione *Leishmania*-macrofago). A volte, in seguito a riattivazioni di infezioni latenti in particolari fasi della vita dell'animale (come la gravidanza) la risposta immunitaria che insorge nei confronti del parassita può stravolgere delicati equilibri (l'immunotolleranza del feto del concepimento) e causare gravi conseguenze (l'aborto, ad esempio nelle infezioni da *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*). In relazione allo studio della risposta immunitaria nei confronti dei parassiti e ai potenziali danni che ne derivano, si sono sviluppate due discipline relativamente "giovani", nate a seguito dell'enorme ampliamento delle conoscenze immunologiche acquisite negli ultimi anni: l'immunoparassitologia e l'immunopatogenesi. Recentemente inoltre ha assunto sempre maggior rilevanza il ruolo dell'immunità innata nei confronti dei patogeni parassitari, in particolare come strumento in grado di indirizzare e istituire risposte acquisite di tipo diverso, più o meno efficienti nel controllo dell'infezione e delle conseguenze dell'infezione stessa.

1.1 – Caratteristiche dei parassiti in grado di influenzare la risposta immunitaria.

Per molti anni le conoscenze di immunologia delle infezioni parassitarie hanno inseguito quelle di immunologia delle infezioni batteriche e virali. Progressi significativi in queste conoscenze sono stati possibili solamente negli ultimi venticinque anni grazie all'introduzione di nuove tecnologie e nuovi concetti. Le nuove scoperte si succedono rapidamente e l'immunoparassitologia è ormai diventata una disciplina a sé stante. Purtroppo solo una piccola parte di queste conoscenze è direttamente applicabile nella medicina veterinaria pratica, in particolare nelle aree della diagnosi e del controllo delle parassitosi. Come in altri settori della medicina veterinaria, la maggior parte degli studi più approfonditi in questo ambito riguarda le infezioni parassitarie nella specie umana.

La diversità della risposta immunitaria nei confronti dei parassiti, rispetto a quella evocata da virus e batteri, è suggerita da semplici osservazioni. Mentre la maggior parte delle infezioni batteriche e virali sono infatti caratterizzate dall'essere eventi acuti e in grado o di uccidere rapidamente l'ospite o di essere arrestate dalla risposta immunitaria, la maggior parte delle infezioni parassitarie sono croniche. L'organismo animale risponde sempre allo stesso modo nei confronti di stimoli analoghi, a prescindere dalla natura del patogeno. Vi sono diverse caratteristiche dei parassiti, assenti nei procarioti, che potrebbero almeno in parte spiegare l'inefficacia nell'evocare una risposta immunitaria e la loro ridotta suscettibilità all'immunità (Barriga O.O., 1997).

Complessità antigenica. I parassiti in generale sono in grado di sintetizzare antigeni in maggior quantità e maggiormente complessi rispetto a virus e batteri. Gli antigeni derivanti dal metabolismo dei parassiti sono definiti antigeni metabolici, prodotti escretori-secretori (ES) o esoantigeni. Solitamente si tratta di enzimi o di cataboliti generati da parassiti vivi e in accrescimento. I parassiti rilasciano anche componenti strutturali detti antigeni somatici, antigeni strutturali o endoantigeni. Questi sono rilasciati di solito dai parassiti solo in seguito alla morte e alla successiva degradazione dei loro tessuti. Numerosi parassiti posseggono antigeni ampiamente presenti in natura (antigeni eterofili). Infine, la presenza dei parassiti potrebbe portare ad un'alterazione

delle proteine dell'ospite in corso d'infezione, facendo sì che esse diventino anigeniche (antigeni derivati dall'ospite) (Miller H.R., 1990). Tra tutti questi antigeni, solo quelli metabolici sembrano contenere sostanze indispensabili al parassita vivente (Arroyo R. et al., 1989). Una neutralizzazione immunitaria di questi componenti risulta essere probabilmente letale al parassita ma questi antigeni in condizioni naturali devono competere con tutti gli altri in grado di attirare l'attenzione del sistema immunitario. Dal momento che gli antigeni metabolici sono solitamente presenti a basse concentrazioni e sono chimicamente simili alle sostanze che compongono l'ospite (sono cioè meno immunogeni) sono raramente in grado di superare la competizione con gli altri ed evocano solo risposte ritardate e di lieve entità (Barriga O.O., 1997).

Complessità fisiologica. I parassiti possiedono una fisiologia più complessa rispetto a batteri e virus, e in tal modo hanno più alternative per eludere i meccanismi effettori dell'immunità. Ad esempio, un elminto potrebbe avere più tipologie di uno stesso enzima (isozimi). Se vengono prodotti anticorpi nei confronti di un tipo, il parassita potrebbe concentrarsi sulla produzione del tipo alternativo, non oggetto di immunità.

Complessità strutturale. A causa delle loro dimensioni e della complessità strutturale i parassiti sono meno suscettibili a meccanismi effettori dell'immunità altrimenti in grado di eliminare batteri e virus. Ad esempio i macrofagi possono solamente scalfire la cuticola esterna o al tegumento degli elminti, e il parassita è probabilmente in grado di riparare questo danno nello stesso tempo in cui viene generato. Anche se vengono prodotti anticorpi neutralizzanti nei confronti di un enzima metabolico (ad esempio in seguito alla morte del parassita), tali anticorpi avrebbero difficoltà ad accedere l'enzima nei tessuti all'interno del parassita vivo. Nel caso in cui un nematode ingerisca macrofagi o anticorpi specifici, è possibile che questi vengano digeriti prima di poter agire contro il parassita. Anche per danneggiare un organismo protozoo suscettibile all'azione degli anticorpi o del complemento è necessario che venga colpito un maggior numero di molecole bersaglio rispetto ad un virus o un batterio (Soulsby E.J.L., 1987).

Complessità biologica. I nematodi entrano nell'organismo ospite come larve infestanti (solitamente L3) e in seguito si sviluppano a L4, L5 e adulti. Ciascuno di questi stadi è dotato dei propri processi biochimici e dei propri antigeni. Nel momento in cui il sistema immunitario reagisce nei confronti dei rispettivi antigeni il parassita ha raggiunto lo stadio successivo, non più soggetto alla risposta immunitaria. Nel caso dei

platelminti, nell'unico caso studiato in maniera approfondita (*Schistosoma*) è stato dimostrato che gli antigeni delle forme invasive del parassita differiscono da quelli dei parassiti stabilitisi nell'organismo. Inoltre gli antigeni del tegumento di questi elminti presentano un turnover talmente rapido che anticorpi o macrofagi adesi al parassita verrebbero probabilmente rilasciati in circolo prima di poter provocare un danno permanente (Warren KS, 1993).

Localizzazione. Numerosi parassiti si localizzano nel lume intestinale ove il complemento non è attivo e altri effettori (ad esempio macrofagi, IgM, IgG) sono presenti in scarse quantità. Altri parassiti si trovano in posizione intracellulare (*Neospora*, *Trichinella*), a livello di sistema nervoso centrale (cisticerchi di *Taenia solium*, *Babesia bovis*, *Plasmodium falciparum*), nell'occhio (*Toxocara*, *Toxoplasma*, cisticerchi di *T. solium*), localizzazioni difficilmente raggiungibili dagli effettori del sistema immunitario.

Presentazione antigenica. Come già accennato i parassiti producono numerosi antigeni che causano allo stesso tempo una competizione antigenica. Poiché gli antigeni protettivi sono meno immunogeni (se così non fosse i parassiti verrebbero facilmente eliminati nella maggior parte dei casi), la risposta immunitaria solitamente è diretta verso antigeni non protettivi.

Inoltre, antigeni prodotti nel lume mucosale causano una produzione preferenziale di IgA, anticorpi che non sono in grado di attivare il complemento o di stimolare la fagocitosi, entrambe tra i principali meccanismi necessari all'eliminazione dei parassiti. Solitamente le IgA agiscono occupando i recettori di batteri e virus responsabili dell'adesione e della successiva invasione delle cellule ospiti. Dal momento che molti parassiti guadagnano l'ingresso nei tessuti dell'ospite mediante azioni meccaniche o enzimatiche (senza cioè la necessità di recettori), le IgA non sono in grado di impedire l'invasione da parte di questi organismi (Barriga O.O., 1997).

Ipobiosi. Numerosi parassiti sono in grado di entrare in ipobiosi o di passare ad una forma latente nel corso dell'infezione (*Toxocara*, *Ancylostoma*, *Strongyloides*, *Trichinella*; *Toxoplasma*, *Neospora* e *Trypanosoma* nelle infezioni croniche). A causa del diminuito tasso metabolico in questa fase la produzione di antigeni e la rispettiva stimolazione immunitaria sono minimi. Inoltre, qualunque risposta immunitaria che agisca su vie metaboliche sarebbe meno efficace (Barriga O.O., 1997).

1.2 – Risposta immunitaria nei confronti degli organismi parassiti.

La maggior parte delle malattie parassitarie sono croniche perché l'immunità innata è debole nei loro confronti e perché i parassiti stessi hanno la capacità di evadere o di resistere all'eliminazione immunitaria acquisita. In ambito umano, vista la scarsa efficacia dei farmaci nell'eliminare i parassiti o visto che la frequenza dei trattamenti richiesti per la clearance dei parassiti non è economicamente sostenibile (quasi esclusivamente nelle aree tropicali endemiche nei paesi in via di sviluppo), l'immunoparassitologia si pone come obiettivo principale la messa a punto di strategie immunizzanti efficaci (Abbas A.K. et al., 2003). In ambito veterinario, lo studio della risposta immunitaria nei confronti dei parassiti, oltre ad avere la finalità di mettere a punto strumenti per la diagnosi ed il controllo delle parassitosi, rappresenta un valido modello per la specie umana, soprattutto quando è possibile impiegare parassiti comuni (agenti di zoonosi) o molto simili a quelli dell'uomo.

Immunità innata nei confronti dei parassiti. Nonostante sia stato dimostrato che numerosi protozoi ed elminti sono in grado di attivare diversi meccanismi dell'immunità innata, questi organismi sono spesso capaci di sopravvivere e replicarsi nei loro ospiti poiché ben adattati a resistere alle difese dell'ospite. La principale risposta immunitaria innata nei confronti dei protozoi è la fagocitosi, ma come già accennato molti di essi sono resistenti all'eliminazione mediata dalla fagocitosi e addirittura possono replicarsi all'interno dei macrofagi (*Leishmania*). I fagociti possono anche aggredire gli elminti e possono secernere sostanze microbicide in grado di eliminare organismi troppo grandi per essere fagocitati. Numerosi elminti possiedono però un tegumento spesso e resistente ai meccanismi citocidi dei neutrofili e dei macrofagi. Alcuni elminti potrebbero anche attivare la via alternativa del complemento, nonostante parassiti prelevati da ospiti infetti sembrano essere in grado di resistere alla lisi mediata dal complemento (White A.C. et al., 1997). La risposta immunitaria innata, in particolare nei confronti dei protozoi, sarà descritta nel Capitolo 2.

Immunità acquisita nei confronti dei parassiti. Come già accennato, risulta evidente come i numerosi parassiti di natura protozoaria ed elmintica posseggano una grande varietà di proprietà biochimiche e strutturali, di cicli biologici e di meccanismi

patogenetici, per cui nella presente dissertazione verranno presi in considerazione solo alcuni degli organismi parassiti degli animali, cioè *Leishmania*, *Neospora* e, solo in parte e in virtù delle analogie con quest'ultimo, *Toxoplasma*. Non ci si deve pertanto stupire se diversi parassiti sono in grado di evocare differenti tipi di risposte, di cui alcuni esempi sono citati nella tabella 1.1.

Parassita	Malattia correlata	Principale meccanismo immunitario protettivo
PROTOZOI		
<i>Plasmodium</i>	Malaria	Anticorpi e linfociti citotossici CD8+
<i>Leishmania</i>	Leishmaniosi (diverse forme)	Le cellule Th1 CD4+ attivano nei macrofagi la distruzione dei parassiti fagocitati-intracellulari
<i>Trypanosoma</i>	Tripanosmiasi africana	Anticorpi
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebiasi	Anticorpi, fagocitosi
ELMINTI (METAZOI)		
<i>Schistosoma</i>	Schistosomiasi	ADCC (citotossicità cellulomediata anticorpo dipendente) mediata dagli eosinofili, macrofagi
Filarie (<i>Onchocerca</i> , <i>Wuchereria</i> , <i>Brugia</i> ...)	Filariasi	Immunità cellulomediata Possibile ruolo degli anticorpi

Tabella1.1 – Diversi tipi di risposte immunitarie evocati da diversi organismi parassitari dell'uomo. Modificato da Abbas A.K. et al., 2003.

In generale, i protozoi patogeni si sono evoluti per poter sopravvivere all'interno delle cellule dell'ospite e pertanto le risposte immunitarie protettive sono mediate da meccanismi simili a quelli responsabili dell'eliminazione dei virus e dei batteri intracellulari. Viceversa, i metazoi come gli elminti sopravvivono quasi esclusivamente nei tessuti in posizione extracellulare e la loro eliminazione dipende spesso da particolari risposte anticorpali (Wakelin D., 1997).

Il principale meccanismo di difesa nei confronti di protozoi in grado di sopravvivere all'interno dei macrofagi è l'immunità cellulomediata, in particolare l'attivazione dei macrofagi da parte di citochine Th1. L'infezione del topo con *Leishmania major*, che come gli altri protozoi di questo genere sopravvive negli endosomi dei macrofagi, è l'esempio più classico di come il predominio di una risposta Th1 o Th2 possa

determinare la resistenza o la suscettibilità alla malattia. La resistenza all'infezione è infatti associata all'attivazione di linfociti T CD4⁺ Th1 in grado di produrre IFN γ e quindi capaci di attivare la distruzione dei parassiti intracellulari da parte dei macrofagi. Al contrario, un'attivazione delle cellule Th2 da parte del protozoo porta a un maggior tasso di sopravvivenza del parassita e a un'esacerbazione delle lesioni a causa delle citochine di tipo Th2 sopprimenti l'attività del macrofago, in particolare l'IL-4.

La maggior parte dei ceppi inbred di topo sono resistenti all'infezione da parte di *L. major*, ma i topi inbred BALB/c sono altamente suscettibili e vanno incontro a morte se infettati con un grande numero di parassiti. Dopo l'infezione i topi dei ceppi resistenti producono grosse quantità di IFN γ in risposta agli antigeni di *Leishmania*, mentre quelli di ceppi colpiti da leishmaniosi ad esito fatale producono maggiori quantità di IL-4 in risposta all'infezione. L'IFN γ attiva i macrofagi ed incrementa il fenomeno di distruzione intracellulare di *Leishmania*, mentre livelli elevati di IL-4 inibiscono l'attivazione dei macrofagi mediata dall'IFN γ stesso. Un trattamento con anticorpi anti-IFN γ in topi resistenti rende questi ultimi suscettibili, così come un trattamento con anticorpi anti-IL-4 in topi suscettibili rende questi ultimi resistenti. Gli stessi risultati sono stati osservati in topi knock-out privi di IFN γ o di IL-4. Il trattamento di topi suscettibili con IL-12 al momento dell'infezione è in grado di indurre resistenza. L'IL-12 incrementa la produzione dell'IFN γ e lo sviluppo delle cellule del comparto Th1. Questa scoperta è la base per l'utilizzo, in ambito umano, dell'IL-12 come adiuvante nei vaccini, non solo per la leishmaniosi, ma anche per altre infezioni che solitamente vengono eliminate dall'immunità cellulomediata (Abbas A.K. et al., 2003).

I protozoi che si replicano all'interno di diversi tipi di cellule ospiti e che causano la loro lisi stimolano specifiche risposte anticorpali e di tipo citotossico, in maniera simile ai virus citopatici. Un esempio di questo fenomeno è rappresentato dalla malaria. Per molti anni si era pensato che il principale meccanismo difensivo fosse costituito dagli anticorpi, e i primi tentativi di messa a punto di un vaccino si erano focalizzati sulla produzione di una risposta umorale. Oggi invece si ritiene che il principale meccanismo coinvolto sia la risposta citotossica (Hunt N.H. et al., 2006).

Le difese nei confronti di numerosi elminti sono mediate dall'attivazione della risposta Th2, che dà luogo alla produzione di anticorpi IgE e all'attivazione di eosinofili. Gli anticorpi IgE si legano alla superficie dell'elminto, gli eosinofili aderiscono a tali

anticorpi mediante i recettori per le Fcε e gli eosinofili attivati secernono granuli di enzimi in grado di distruggere i parassiti. Spesso in corso di infestazioni elmintiche si assiste alla produzione di anticorpi IgE specifici e alla comparsa di eosinofilia. Queste risposte sono attribuite alla propensione degli elminti di stimolare il subset Th2 dei T helper CD4+ che secernono a loro volta IL-4 e IL-5. L'IL-4 stimola la produzione di IgE, l'IL-5 stimola lo sviluppo e l'attivazione degli eosinofili. Gli eosinofili potrebbero essere più efficaci nell'eliminazione degli elminti rispetto ad altri leucociti perché i loro granuli prevalentemente costituiti da proteine basiche potrebbero risultare maggiormente tossici nei confronti degli elminti rispetto agli enzimi proteolitici e agli intermedi reattivi dell'ossigeno prodotti da neutrofili e macrofagi (Klion A.D. et al, 2004; Abbas A.K. et al, 2003). L'espulsione di alcuni nematodi gastrointestinali potrebbe essere dovuta ad un meccanismo dipendente dall'IL-4 non ancora ben definito ma apparentemente indipendente dalla presenza delle IgE.

La risposta acquisita ai parassiti può anche contribuire al danno tissutale (classicamente, è a questo fenomeno che ci si riferisce parlando di immunopatogenesi). Alcuni parassiti ed i loro prodotti, ad esempio, causano la formazione di reazioni granulomatose con successiva comparsa di fibrosi. Le uova di *Schistosoma mansoni* deposte nel fegato stimolano le cellule T CD4+ che a loro volta attivano i macrofagi e inducono una risposta di ipersensibilità ritardata (delayed type hypersensitivity, DTH). Le reazioni DTH danno luogo alla formazione di granulomi attorno alle uova. I granulomi circoscrivono le uova degli schistosomi ma la grave fibrosi associata a questa risposta immunitaria cellulomediata cronica porta alla distruzione del flusso venoso epatico, all'ipertensione portale e alla cirrosi (Wakelin D., 1997). Nelle filariasi linfatiche, la presenza dei parassiti all'interno dei vasi linfatici evoca risposte cellulomEDIATE croniche e porta alla fibrosi. La fibrosi poi a sua volta è responsabile dell'ostruzione e del grave edema dei vasi linfatici (Freedman D.O., 1998). Le infestazioni parassitarie croniche e persistenti sono spesso associate alla formazione di immunocomplessi di antigeni parassitari e di anticorpi specifici. Tali immunocomplessi possono depositarsi sia nei vasi sanguigni che nel rene e causare vasculite e nefrite, rispettivamente. Ad esempio, tale fenomeno avviene nella schistosomiasi, nella malaria e nella leishmaniosi.

1.3 – Evasione della risposta immunitaria da parte dei parassiti.

I parassiti evadono l'immunità protettiva sia riducendo la loro immunogenicità che mediante l'inibizione delle risposte dell'ospite.

I parassiti possono modificare i loro antigeni di superficie durante il loro ciclo vitale negli ospiti vertebrati. Sono state ben descritte almeno due forme di variazione antigenica. La prima è un'alterazione dell'espressione antigenica stadio-specifica, ad esempio quando gli stadi tissutali maturi del parassita producono antigeni diversi rispetto agli stadi infettanti. Ad esempio, lo sporozoite infettante della malaria è antigenicamente diverso dai merozoiti che risiedono nell'ospite e sono responsabili dell'infezione cronica. Al momento della risposta del sistema immunitario nei confronti degli sporozoiti, il parassita si è differenziato, esprime nuovi antigeni e non è più un bersaglio disponibile per l'eliminazione da parte del sistema immunitario (Long C. A., 1993). Il secondo esempio, ancora più notevole, di variazione antigenica è la variazione continua dei principali antigeni di superficie osservata nei tripanosomi africani, come *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma rhodesiense*. La variazione antigenica continua dei tripanosomi è probabilmente dovuta a una variazione programmata dell'espressione dei geni che codificano per i principali antigeni di superficie. Gli individui infetti manifestano picchi di parassitemia, ciascuno delle quali è costituito da parassiti che esprimono un antigene di superficie differente rispetto a quello espresso dai parassiti del picco precedente. Pertanto, nel momento in cui l'ospite produce anticorpi specifici nei confronti del parassita, è emersa una nuova variante antigenica. Nel corso di un'infezione si possono presentare più di un centinaio di questi picchi. Una conseguenza della variazione antigenica dei parassiti è la difficoltà di vaccinare in maniera efficace gli individui a rischio di contrarre queste infezioni (Barry J.D. et al., 1992).

I parassiti possono diventare resistenti ai meccanismi effettori del sistema immunitario nel corso della loro permanenza all'interno dell'ospite vertebrato. L'esempio migliore è forse rappresentato dalle larve degli schistosomi che migrano verso i polmoni degli animali infestati e durante la migrazione sviluppano un tegumento resistente all'azione del complemento e dei linfociti citotossici. Non sono ancora noti i meccanismi biochimici alla base di questo cambiamento (Butterworth A.E.B., 1994).

I protozoi parassiti potrebbero mettersi al riparo dalle azioni del sistema immunitario o stabilendosi all'interno delle cellule dell'ospite o mediante lo sviluppo di cisti resistenti ai meccanismi effettori del sistema immunitario (ne sono esempio classico *T. gondii* e *N. caninum*). Numerosi elminti parassiti vivono all'interno del lume intestinale ed in tal modo sono protetti dai meccanismi effettori del sistema immunitario cellulomediato. I parassiti potrebbero inoltre rilasciare il loro rivestimento (antigenico) o spontaneamente o in seguito al legame con anticorpi specifici. Il rilascio di questi antigeni rende i parassiti resistenti ai meccanismi effettori immunitari (Maizels R.M. et al., 1993).

I parassiti possono inibire le risposte dell'ospite mediante numerosi meccanismi. Nel corso di gravi infestazioni epatiche e spleniche da parte degli schistosomi, così come nelle infestazioni da filaridi è stata osservata anergia delle cellule T nei confronti degli antigeni parassitari. Non sono ancora del tutto chiari i meccanismi di questa iporesponsività immunologica. Nelle filariasi linfatiche l'infezione dei linfonodi, cui consegue la distruzione dell'architettura linfonodale stessa, potrebbe contribuire ai deficit immunitari osservati. In corso di malaria e di tripanosmiasi africana è stato osservato uno status di immunosoppressione aspecifico e generalizzato. Questo deficit immunitario è stato attribuito alla produzione di citochine ad azione immunosoppressiva da parte di macrofagi attivati e cellule T, nonché a un'attivazione incompleta delle cellule T (Wakelin D., 1997).

Nel complesso, lo studio dei meccanismi d'evasione da parte dei parassiti nei confronti dell'immunità è alla base dello sviluppo di strategie immunizzanti efficaci, attualmente ancora lontane da risultati concreti ed applicabili, con qualche rara eccezione (i cestodi, nei quali però è efficace una risposta anticorpale e non si assiste a variazioni antigeniche) (Lightowlers M.W., 2006).

2 – LA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA: COMPONENTI E RUOLO NELLE INFEZIONI PROTOZOARIE

L'immunità innata è la prima linea di difesa nei confronti delle infezioni. I meccanismi dell'immunità innata esistono già prima dell'incontro con i microrganismi e vengono attivati rapidamente da parte dei patogeni prima dello sviluppo della risposta immunitaria acquisita. Anche da un punto di vista filogenetico l'immunità innata è uno dei più antichi meccanismi di difesa contro i microrganismi ed è presente in tutti gli organismi multicellulari, compresi le piante e gli insetti. (de Wit P.J., 2007; Ferrandon D. Et al., 2007). La risposta immunitaria acquisita, le cui attività sono mediate dai linfociti T e B, che risulta essere dotata di maggior efficacia e di memoria, è comparsa negli animali mascellati ed ha superato quella innata per migliorare le difese dell'ospite nei confronti dei microrganismi (Abbas A.K. et al, 2003).

L'immunità innata svolge tre funzioni principali:

-L'immunità innata è la risposta iniziale nei confronti dei microrganismi in grado di prevenire l'infezione dell'ospite e, in molti casi, è in grado di eliminare i microrganismi. L'importanza dell'immunità innata nella difesa dell'ospite è stata dimostrata da studi che hanno evidenziato come l'inibizione o l'eliminazione dei diversi meccanismi dell'immunità innata aumenta fortemente la suscettibilità alle infezioni, anche nei casi in cui la risposta acquisita è integra e funzionante. (Carrera L. et al., 1996).

Molti microrganismi, compresi i protozoi, hanno messo a punto strategie per resistere all'immunità innata, e queste strategie sono di vitale importanza per la patogenicità dei microrganismi (Sacks D. et al., 2002). La risposta acquisita, più potente e specializzata, è essenziale per l'eliminazione di quei patogeni in grado di resistere ai meccanismi d'azione dell'immunità innata.

-I meccanismi effettori dell'immunità innata vengono spesso impiegati anche dalla risposta immunitaria acquisita per eliminare i patogeni. Ad esempio, nell'immunità cellulo-mediata i linfociti T antigene-specifici producono delle citochine in grado di attivare importanti meccanismi effettori dell'immunità innata, in particolare la fagocitosi (Rossol M. et al., 2007).

Nell'immunità umorale i linfociti B producono anticorpi che per eliminare i microrganismi impiegano due meccanismi effettori dell'immunità innata, i fagociti ed il complemento (Macura N. et al., 2007).

L'immunità innata nei confronti dei microrganismi stimola la risposta acquisita ed è in grado di influenzare la natura della risposta acquisita stessa in modo da rendere quest'ultima efficace in maniera ottimale nei confronti di diversi tipi di patogeni. Pertanto, l'immunità innata non ha solo finalità difensive subito dopo un'infezione, ma “avvisa” anche della presenza di un'infezione, nei confronti della quale deve insorgere una risposta acquisita. Inoltre, i diversi componenti della risposta immunitaria innata spesso reagiscono in maniera diversa nei confronti di microrganismi di diversa origine (intra- o extra-cellulari, ad esempio) e pertanto sono in grado di influenzare la tipologia di risposta acquisita che si sviluppa successivamente (rispettivamente, cellulo-mediata o umorale) (Clark R. et al., 2005).

Alcuni componenti dell'immunità innata sono già attivi ancora prima dell'infezione (principalmente le barriere all'ingresso dei microrganismi fornite dalle superfici epiteliali), altri invece sono normalmente inattivi ma predisposti a rispondere rapidamente alla presenza dei microrganismi; questi comprendono i fagociti e il sistema complemento.

Caratteristiche del riconoscimento da parte dell'immunità innata. La immunità innata possiede specificità nei confronti dei prodotti dei microrganismi, e in questo differisce di molto rispetto alla specificità dell'immunità acquisita (Pålsson-McDermott E.M. et al., 2007). I componenti dell'immunità innata riconoscono strutture che sono caratteristiche degli organismi patogeni e che non sono presenti sulle cellule dei mammiferi. Strutture condivise da particolari classi di patogeni sono in grado di evocare risposte innate di diverso tipo. Queste strutture comprendono acidi nucleici caratteristici dei patogeni, proteine dotate di caratteristiche tipiche dei microrganismi (ad esempio, l'inizio con la N-formilmetionina, tipico delle proteine batteriche); lipidi e carboidrati complessi sintetizzati esclusivamente dai microrganismi (ad esempio i lipopolisaccaridi – LPS – dei batteri gram-negativi e gli oligosaccaridi ricchi di mannosio che si ritrovano nelle glicoproteine dei patogeni, tra cui *Leishmania*) (Lee M.S. et al., 2007).

I bersagli dell'immunità innata sono stati definiti “molecular patterns” (modelli molecolari) ed i recettori che si legano a queste strutture sono stati definiti recettori di riconoscimento dei pattern (Arancibia S.A. et al., 2007; Feizi T., 2000). A causa di questa specificità per le strutture microbiche il sistema immunitario innato è in grado, al pari di quello acquisito, di riconoscere il self dal non-self (Danilova N., 2006).

Il sistema immunitario innato si è evoluto per il riconoscimento di prodotti microbici spesso essenziali per la sopravvivenza dei patogeni stessi (RNA double-stranded, parte strutturale di alcuni virus) (Bowie A.G. et al., 2007) ma ciò non è facile in organismi complessi come i protozoi (Barriga O.O., 1997). La capacità di riconoscere classi di molecole, anziché antigeni specifici, deriva dal fatto che i recettori del sistema immunitario innato sono codificati nella linea germinale; ciò riduce le possibilità di riconoscimento ad un massimo di 10^3 molecular pattern appartenenti a microrganismi (contro gli ipotetici 10^7 antigeni diversi che può riconoscere il sistema acquisito) (Abbas A.K. et al, 2003).

Componenti dell'immunità innata. Il sistema immunitario innato è costituito da barriere epiteliali, cellule circolanti e proteine in grado di riconoscere i patogeni o le sostanze prodotte durante un'infezione e che nell'insieme danno inizio alle risposte in grado di eliminare i microrganismi. I principali meccanismi effettori dell'immunità innata sono i neutrofili, i fagociti mononucleati e le cellule natural killer (NK). Queste cellule attaccano quei patogeni che abbiano creato una breccia nelle barriere epiteliali e siano entrate nei tessuti o in circolo (Papazahariadou M. et al., 2007). Nel caso in cui i patogeni entrano in circolo, possono essere combattuti con diverse proteine plasmatiche (le principali proteine circolanti dell'immunità innata sono quelle del sistema complemento ed altre proteine tra cui la lectina in grado di legare il mannosio) (Abbas A.K. et al., 2003). A fianco di queste strutture cellulari e molecolari sono presenti le cellule dendritiche (DC), responsabili della presentazione antigenica (antigen presenting cells, APC) – funzione condivisa in parte con macrofagi e linfociti B – e soprattutto del priming dei linfociti T antigene-specifici, vale a dire del passaggio dall'immunità innata a quella acquisita (Steinman R., 1991).

2.1 – Barriere epiteliali.

Le barriere epiteliali intatte formano delle barriere fisiche tra i microrganismi nell'ambiente esterno e nei tessuti nell'ospite. Le principali interfacce tra l'ambiente e l'ospite sono la cute e le superfici mucose dell'apparato gastroenterico e respiratorio (Schleimer R.P. et al., 2007). Gli epitelii producono inoltre citochine dell'immunità innata (ad esempio i cheratinociti producono IL-1) e peptidi ad azione antibiotica naturale. I più noti di questi peptidi sono le difensine, peptidi ricchi di cisteina composti da 29-34 aminoacidi che sono presenti nella cute di numerose specie, compresi i mammiferi; tali proteine sono anche presenti in abbondanza nei granuli dei neutrofili e la loro sintesi viene incrementata da citochine quali l'IL-1 e il tumor necrosis factor (TNF) prodotti da macrofagi ed altre tipologie cellulari in risposta ai patogeni (Sahl P.G. et al., 2005). Per quanto riguarda il ruolo delle difensine nei confronti dei patogeni protozoi, ad esempio, è stato dimostrato che la difensina α -1 è in grado sia di eliminare *Trypanosoma cruzi* mediante formazione di pori nella membrana dei tripomastigoti, sia (in seguito ad una preincubazione con tale difensina) di ridurre la loro infettività in vitro (Madison M.N. et al., 2007).

Non sono del tutto noti né i meccanismi d'azione di questi antibiotici naturali né come gli epitelii riconoscano la presenza dei patogeni (Abbas A.K. et al., 2003).

Le barriere epiteliali e le cavità sierose contengono rispettivamente linfociti T intraepiteliali e il sottotipo B-1 dei linfociti B e queste cellule potrebbero essere coinvolte nel riconoscimento, nonché nella risposta ai microrganismi incontrati. I linfociti T intraepiteliali sono presenti nell'epidemie della cute e all'interno degli epitelii mucosali, sono dotati di recettori antigenici come le altre cellule T e, secondo questo criterio, dovrebbero appartenere alla risposta immunitaria acquisita. Da un punto di vista funzionale però tali cellule esprimono una limitata diversità di recettori antigenici derivati da sequenze della linea germinale, analogamente ai recettori dell'immunità innata (Abbas A.K. et al., 2003). In alcune specie, quali il topo ed il pollo, la maggior parte dei linfociti intraepiteliali esprime i recettori T $\gamma\delta$. È stato dimostrato, nell'ambito della risposta ai protozoi, come questi T linfociti intraepiteliali siano in grado di conferire resistenza innata nei confronti di *Cryptosporidium parvum* nel modello murino (mediante la secrezione di IFN γ) (Leav B.A. et al., 2005).

La cavità peritoneale contiene una popolazione di linfociti B, denominata B-1, i cui recettori antigenici pur essendo immunoglobuline prodotte dalla ricombinazione genetica somatica sono dotati di una diversità limitata, molto simile a quella dei recettori antigenici dei linfociti T intraepiteliali; tradizionalmente queste cellule sono state ritenute responsabili della produzione di anticorpi naturali (IgM specifiche per molecole condivise da numerose tipologie batteriche prodotte prima che l'organismo entri in contatto con tali microrganismi) (Abbas A.K. et al., 2003). Nel modello murino è stato dimostrato che tale tipologia linfocitaria è in grado di proteggere dall'infezione con *T. gondii* topi privi di linfociti B (Chen M. et al., 2003).

2.2 – Fagociti: neutrofili e macrofagi.

I fagociti, compresi neutrofili e macrofagi, sono cellule la cui funzione primaria è quella di identificare, ingerire e distruggere i microrganismi.

I neutrofili, definiti anche leucociti polimorfonucleati, sono la popolazione più abbondante di cellule bianche circolanti e intervengono nelle primissime fasi della risposta infiammatoria. Il citoplasma contiene granuli di due tipi. La maggior parte, denominati granuli specifici, sono riempiti di enzimi quali il lisozima, la collagenasi e l'elastasi. Il resto dei granuli dei neutrofili, denominati azzurrofilo, sono lisosomi contenenti enzimi ed altre sostanze microbicide (Borregaard N. et al., 2007). Nei mammiferi, la produzione giornaliera di neutrofili è molto elevata (nell'uomo, ad esempio, vengono prodotti 10^{11} neutrofili al giorno) ma è compensata dalla loro breve esistenza: sono presenti nel torrente ematico per 6 ore e se entro questo lasso di tempo non vengono reclutati in un sito di infiammazione vanno incontro ad apoptosi e a fagocitosi da parte dei macrofagi epatici e splenici (Abbas A.K. et al., 2003).

I macrofagi e i loro precursori circolanti, denominati monociti, rivestono un ruolo centrale nell'immunità innata ed in quella acquisita e sono importanti cellule effettrici per l'eliminazione dei patogeni. Le cellule di tipo macrofagico sono, da un punto di vista filogenetico, i più antichi mediatori dell'immunità innata. I moscerini *Drosophila* rispondono alle infezioni circondando i microrganismi con gli "emociti", cellule simili ai macrofagi ed in grado di fagocitare i microrganismi e di circoscrivere l'infezione tramite l'induzione della coagulazione dell'emolinfa circostante (Tzou P. et al., 2002). I

monociti del sangue si sviluppano nel midollo osseo e possono restare nel circolo per periodi abbastanza lunghi. Dopo il loro ingresso nei tessuti, i monociti si differenziano in macrofagi. I macrofagi risiedono nel connettivo subepiteliale, negli interstizi di diversi organi, intorno ai capillari sinusoidi di fegato e milza e nei seni linfatici dei linfonodi. Pertanto, questi fagociti sono posti strategicamente in quelle localizzazioni dove i microrganismi potrebbero penetrare nell'ospite. I macrofagi reagiscono ai microrganismi con la stessa velocità dei neutrofili, ma persistono per un periodo di tempo maggiore nei siti dell'infiammazione. Pertanto, i macrofagi sono le principali cellule effettrici nelle fasi tardive dell'immunità innata, 1 o 2 giorni dopo l'infezione. I macrofagi vivono più a lungo dei neutrofili e a differenza di questi ultimi non sono differenziati in maniera terminale e possono andare incontro a divisioni cellulari nel sito dell'infiammazione (Kumar S. et al., 2006) e, come è noto, sono tra le principali cellule presentanti l'antigene (antigen presenting cells, APCs).

Le risposte funzionali dei fagociti nella difesa dell'ospite sono costituite da fasi successive cioè il reclutamento attivo delle cellule nei siti dell'infezione, il riconoscimento dei microrganismi, la fagocitosi e la distruzione dei microrganismi ingeriti. Inoltre, i macrofagi sono in grado di produrre citochine dotate a loro volta di importanti funzioni sia nella risposta innata che in quella acquisita (Bing R.J. et al., 1992).

Reclutamento dei fagociti al sito dell'infezione – I neutrofili e i monociti circolano normalmente nel sangue e non migrano nei tessuti. Il loro reclutamento verso i siti d'infezione è un processo a più fasi che comporta l'adesione alle cellule endoteliali (con stabilità sempre maggiore, prima grazie alle selectine e poi alle integrine) e la successiva migrazione attraverso l'endotelio. I macrofagi residenti nei tessuti in grado di riconoscere i patogeni secernono le citochine TNF, IL-1 e altre chemochine. Il TNF e l'IL-1 agiscono sulle cellule endoteliali delle venule postcapillari adiacenti al sito dell'infezione e inducono l'espressione delle prime molecole di adesione che danno inizio al reclutamento (Abbas K.A. et al., 2003).

Riconoscimento dei patogeni da parte di neutrofili e macrofagi – I neutrofili ed i macrofagi esprimono recettori di superficie che permettono loro lo svolgimento di

numerose funzioni: possono riconoscere i microrganismi nel sangue e nei tessuti, stimolarne la fagocitosi (e la successiva eliminazione), nonché possono stimolare la produzione di citochine e sostanze microbicide ed infine causare la migrazione delle cellule al sito d'infezione. Esistono diverse classi di recettori che mediano l'adesione dei patogeni e la loro successiva internalizzazione.

Tra i principali recettori in grado di mediare queste funzioni rientrano i recettori per il mannosio; la MBL (Mannose-binding-lectin), ad esempio, è una lectina dei macrofagi che lega le molecole terminali di mannosio e fucosio delle glicoproteine e dei glicolipidi. Questi zuccheri sono dei tipici costituenti delle pareti dei microrganismi, mentre le glicoproteine ed i glicolipidi dei mammiferi terminano con l'acido sialico o con l' N-acetilgalattosamina. Gli antigeni di *Trichinella spiralis*, per esempio, sono ricchi di residui di oligomannosio, ed in uno studio si è dimostrato come il recettore MR (Mannose Recognizing) presente sulla superficie dei macrofagi riconosca e legghi componenti di larve muscolari di *Trichinella spiralis* (Gruden-Movsesijan A. et al., 2006). Per quanto riguarda i protozoi che presentano sulla superficie lipofosfoglicani ricchi di mannosio che reagiscono con la MBL vi sono diversi stadi di protozoi del genere *Leishmania* (Green P.J. et al., 1994), gli amastigoti di *Trypanosoma cruzi* (Kahn S. et al., 1995) ed infine anche le proteine di *Plasmodium falciparum* localizzate sugli eritrociti infetti sono dei ligandi per questi recettori (Klabunde J. et al., 2002). L'importanza della MBL è stata confermata dal fatto che il polimorfismo del gene che regola l'espressione di MBL è inoltre associato ad una maggiore suscettibilità alla malaria in Gabon (Luty A.J. et al., 1998).

I recettori scavenger, definiti in origine come molecole in grado di legare particelle LDL (low density lipoprotein) non più in grado di legarsi ai recettori LDL convenzionali si possono legare anche a numerose molecole dei patogeni, oltre che alle LDL modificate. CD36, ad esempio, è un recettore scavenger implicato nella patogenesi della malaria e nella difesa innata dalla malattia. In uno studio sulla risposta immunitaria alla malaria in vivo si è dimostrato come topi knockout per CD36 (-/-) infettati con *Plasmodium chabaudi chabaudi* siano andati incontro a una malattia grave e letale più spesso rispetto a topi wild type. Questi risultati forniscono anche una prova diretta del fatto che la secrezione di TNF α può essere CD36-dipendente e che pertanto che tale interazione

svolge un ruolo nel modulare la secrezione di citochine da parte dell'ospite e quindi nel controllo dell'infezione da malaria (Patel S.N. et al., 2007).

I recettori per le opsonine promuovono la fagocitosi dei microrganismi rivestiti da numerosi tipi di proteine. Il processo di rivestimento di un patogeno per renderlo bersaglio della fagocitosi è definito opsonizzazione, e le sostanze che lo rivestono sono definite opsonine. Queste sostanze comprendono gli anticorpi, le proteine del complemento e le lectine. Uno dei più efficienti sistemi per l'opsonizzazione delle particelle è il loro rivestimento con anticorpi IgG, definiti opsonine specifiche e sono riconosciuti dai recettori ad alta affinità dei fagociti, denominati FcγRI. È noto come l'ingresso per fagocitosi di *Leishmania* nel macrofago possa essere siero-dipendente o indipendente (Handman E., 1999). I componenti del complemento, in particolare i frammenti della proteina C3 del complemento, sono anch'essi potenti opsonine, poiché i fagociti esprimono un recettore, denominato recettore del complemento di tipo 1 (type 1 complement receptor, CR1) che riconosce i prodotti derivati dalla C3. Tali frammenti vengono prodotti quando il complemento viene attivato o mediante la via classica (anticorpo-dipendente) o mediante quella alternativa (anticorpo-indipendente). La proteina C-reattiva (CRP, C-reactive Protein) e la proteina amiloide sierica (SAP, serum amyloid protein) sono molecole di riconoscimento associate alla membrana che appartengono alla famiglia delle pentraxine, la cui produzione è elevata in risposta all'infiammazione. La CRP e la SAP fungono da opsonine legando fosforilcolina o fosfotiletanolamina sulla superficie batterica o delle cellule danneggiate. Queste catene laterali si trovano comunemente sulla superficie di nematodi, cestodi e trematodi (Haslam S.M. et al., 1999). CRP lega anche gli zuccheri fosforilati, in particolare il galattosio-6-fosfato, che si trova comunemente sulle molecole LPG di superficie dei promastigoti di *Leishmania donovani* e *Leishmania mexicana* (Culley F.J. et al., 2000). L'opsonizzazione da parte di CRP, oltre ad attivare il complemento attraverso la via classica, può impedire direttamente a *Leishmania* l'ingresso nei macrofagi. CRP inoltre lega gli sporozoi e protegge contro la malaria pre-eritrocitica (Pied S. et al., 1989). Esistono numerose proteine plasmatiche che possono rivestire i patogeni e che vengono successivamente riconosciute dai fagociti, compresi la fibronectina e il fibrinogeno. Ad esempio, le integrine si legano a particelle rivestite di fibrinogeno. Sia i recettori per le Fc degli anticorpi che i recettori per C3b mediano per segnali di attivazione dei fagociti.

In uno studio è stato provato che i macrofagi umani necessitano di MFR (mannose-fucose receptor) e di CR1 indipendentemente uno dall'altro per la fagocitosi di promastigoti di *Leishmania donovani* (Wilson M.E. et al., 1988). Esistono poi recettori che sono responsabili dell'attivazione dei fagociti ma che non partecipano direttamente nel processo di ingestione dei patogeni: i toll-like receptors.

I toll-like receptors (TLR) sono omologhi delle proteine di *Drosophila* denominate "Toll" e hanno un ruolo fondamentale nell'attivazione dei fagociti in risposta a diverse tipologie e componenti dei patogeni. Ad oggi, sono stati identificati almeno 13 TLR (Roach J.C. et al., 2005) e ciascuno sembra essere indispensabile per la risposta nei confronti di una classe di patogeni infettivi. Numerosi TLR rivestono importanti ruoli nelle risposte cellulari all'LPS, ad altri proteoglicani batterici e ai nucleotidi CpG non metilati, tutte strutture rinvenute esclusivamente sui batteri. Questi recettori funzionano come chinasi associate al recettore per stimolare la produzione di sostanze microbicide e di citochine nei fagociti.

I ligandi dei diversi TLR sono le molecole che più delle altre di origine microbica/parassitaria possono essere definite pathogen associated molecular patterns "PAMP". Per quanto riguarda i protozoi e la loro interazione con i TLR ci sono ancora pochi dati disponibili riguardo all'identificazione dei ligandi dei TLR (Gazzinelli R.T. et al., 2006). Le strutture protozoarie in grado di attivare le cascate di segnali in seguito al loro legame con i TLR meglio conosciute sono le GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchors. Tali molecole fungono da ancore per le proteine alla superficie delle cellule eucariotiche; non si sa come sia possibile che queste molecole, presenti negli eucarioti, non provochino fenomeni autoimmunitari (Gazzinelli R.T. et al., 2006). Le GPI anchors di *Trypanosoma cruzi* sembrano legarsi al TLR-2 (in particolare al dimero TLR-2/TLR-6), sebbene sia stato dimostrato anche il coinvolgimento di CD14 e TLR-4 (Campos M.A. et al., 2001). Analogamente a quanto accade per *T. cruzi*, anche altri protozoi Kinetoplastida come *Leishmania* posseggono GPI anchors in grado di legarsi ai TLR e di attivarne i segnali. I promastigoti infettanti sono rivestiti superficialmente di molecole legate a GPI anchors; le principali di queste molecole sono i lipofosfoglicani. I lipofosfoglicani di *L. major* sono stati in grado di attivare i macrofagi e le cellule NK murine mediante il TLR-2 (de Veer M.J. et al., 2003; Becker I. et al., 2003); per quanto riguarda i macrofagi, questo legame è stato indispensabile anche impiegando *L.*

donovani (Flandin J.F. et al., 2006). Anche negli Apicomplexa è stato dimostrato il coinvolgimento delle GPI anchors nell'attivazione di reazioni mediate dai TLR-2 e TLR-4. Ad esempio, i merozoiti di *P. falciparum* sono in grado di indurre la sintesi di TNF mediante l'interazione delle loro GPI anchors principalmente con TLR-2 e TLR-4 e, secondariamente, con TLR-4 (Krishnegowda G. et al., 2005; Naik R.S. et al., 2000). Impiegando GPI anchors purificate da tachizoiti di *T. gondii* su una linea macrofagica murina è stato possibile dimostrare che tali molecole sono in grado di promuovere l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B e la produzione di TNF mediante l'interazione con TLR-2 e TLR-4 (Gazzinelli R.T. et al., 2006).

Esistono altre molecole di derivazione protozoaria in grado di legarsi ai differenti TLR, ad esempio la proteina Tc52 di *T. cruzi* stimola una risposta pro-infiammatoria legandosi al TLR-2 (Ouaissi A. et al., 2002). Da dati recenti, inoltre, sembra che anche il TLR-9 (tradizionalmente ritenuto responsabile del riconoscimento del DNA CpG di origine batterica) sia importante nell'induzione di risposte pro-infiammatorie da parte di patogeni protozoari. È stato infatti dimostrato che il DNA genomico di *T. cruzi* e *T. brucei* è dotato di attività pro-infiammatoria mediata dal TLR-9 (Bafica A. et al., 2006; Drennan M.B. et al., 2005). Per quanto riguarda *T. gondii*, è stata individuata una proteina simile alla profilina (PFTG) che ha causato l'attivazione del TLR-11 (con conseguente produzione di IL-12) nel topo. PFTG è una proteina relativamente conservata in molti Apicomplexa, e ciò la rende un buon candidato al ruolo di PAMP; a livello funzionale, inoltre, sembra legata al motore actino-miosinico legato all'invasione attiva delle cellule che caratterizza questo insieme di organismi. In questo caso, è difficile applicare questo risultato in ambito umano, visto che nell'uomo i geni che codificano per TLR-11 sono non funzionali (Yarovinsky F. et al., 2005). Sempre per quanto riguarda *T. gondii*, è stata dimostrata l'attivazione dei TLR-2 e TLR-4 da parte, rispettivamente, di heat shock protein e preparazioni parzialmente purificate di tachizoiti del parassita (Aosai F. et al., 2002; Del Rio L. et al., 2004).

Anche per quanto riguarda quanto accade in seguito al legame con i TLR da parte di un organismo protozario, non sono ancora molti i dati disponibili. Solitamente i TLR interagiscono con una proteina adaptor mediante i loro domini citoplasmatici; tali domini nei TLR sono simili a quello del recettore per IL-1, e sono definiti pertanto domini TIR (Toll/Interleukin-1 receptor) (O'Neill L.A. et al., 2003). La proteina adaptor

che interagisce con i TIR più nota è il myeloid differentiation primary-response gene 88 (MyD88), che trasduce i segnali di tutti i TLR (ad eccezione di TLR3) e dei recettori per IL-1 e IL-18 (Adachi O. et al., 1998; Takeuchi O. et al., 2002). La principale dimostrazione del ruolo fondamentale svolto dai domini TIR nella mediazione delle risposte innate è stata ottenuta mediante l'impiego di topi knockout per MyD88 sottoposti a infezione con diversi parassiti protozoari (Drennan M.B. et al., 2005; Campos M.A. et al., 2004; Muraille E. et al., 2003; Scanga C.A. et al., 2002). Tali animali sono risultati essere più suscettibili di quelli wild type nelle infezioni da *T. gondii* (Scanga C.A. et al., 2002), *T. cruzi* (Campos M.A. et al., 2004), *T. brucei* (Drennan M.B. et al., 2005). Tale suscettibilità è associata di solito all'incapacità di sintetizzare IL-12 e IFN γ e in ultima analisi di evocare una risposta protettiva di tipo Th1 (Gazzinelli R.T. et al., 2006). La delezione di singoli TLR nel topo non è mai stata in grado di riprodurre gli effetti della delezione di MyD88 in seguito all'infezione con diversi protozoi come *T. gondii* (Chen M. et al., 2002; Mun H.S. et al., 2003) e *L. major* (Kropf P. et al., 2004), a dimostrazione del fatto che la risposta innata nei confronti di questa classe di patogeni è mediata da più di un TLR, espressi sia sulla stessa cellula che, probabilmente, su tipi cellulari diversi (Gazzinelli R.T. et al., 2006).

I fagociti inoltre esprimono recettori per le citochine prodotte in reazione ai microrganismi. Una delle citochine più importanti da questo punto di vista è l'IFN γ , secreto dalle cellule natural killer (NK) nel corso della risposta immunitaria innata e dai linfociti T attivati dall'antigene durante l'immunità acquisita. L'IFN γ è infatti la principale citochina in grado di attivare i macrofagi (Abbas A.K. et al., 2003).

Fagocitosi dei microrganismi – I neutrofili e i macrofagi ingeriscono microrganismi che hanno legato all'interno di vescicole, all'interno delle quali i microrganismi vengono solitamente distrutti. La fagocitosi è un processo dipendente dal citoscheletro caratterizzato dall'ingestione di particelle di grandi dimensioni ($>0.5\mu\text{m}$). I recettori di superficie responsabili della fagocitosi oltre ad essere responsabili dell'adesione stessa mediano segnali per l'ingestione e per la successiva attivazione delle funzioni microbicide dei fagociti.

Distruzione dei microrganismi fagocitati – I neutrofili ed i macrofagi attivati distruggono i microrganismi fagocitati mediante la produzione di molecole microbicide all'interno di fagolisosomi. Diversi recettori in grado di riconoscere i microrganismi, compresi i TLR, i recettori accoppiati alla proteina G, le Fc, i recettori per la C3, nonché i recettori per le citochine (soprattutto IFN γ) cooperano per la distruzione dei microrganismi fagocitati. La fusione delle vescicole fagocitiche (fagosomi) con i lisosomi dà luogo alla formazione dei fagolisosomi, dove si concentrano i meccanismi microbicidi. I macrofagi ed i neutrofili attivati convertono l'ossigeno molecolare in intermedi reattivi dell'ossigeno (reactive oxygen intermediates, ROI), molto attivi nell'ossidazione e nella distruzione dei microrganismi (e di altre cellule, in caso). Il sistema primario di generazione dei radicali liberi è il sistema dell'ossidasi dei fagociti. L'ossidasi dei fagociti è un enzima la cui attività è indotta ed attivata da numerosi stimoli, come l'IFN γ e i segnali provenienti dai TLR. La funzione di questo enzima è di ridurre l'ossigeno molecolare a ROI, processo denominato "burst respiratorio". Nel caso delle infezioni da *Giardia lamblia*, protozoo intestinale causa di diarrea a diffusione ubiquitaria, si è visto che tale patogeno è in grado di innescare nei neutrofili un burst respiratorio che è in grado di combattere questo protozoo. In particolare, è stato dimostrato che la questa reazione è strettamente dipendente da fenomeni di opsonizzazione (con sieri immuni ma anche con siero non immune) ed è mediata dai recettori per il complemento (Arbo A. et al., 2006).

Oltre ai ROI, i macrofagi producono anche intermedi reattivi dell'azoto, prevalentemente l'ossido nitrico (NO), mediante un enzima denominato iNOS (inducibile nitric oxide synthase). L'iNOS è un enzima citosolico assente nei macrofagi a riposo ma che può venire indotto mediante LPS ed altri prodotti microbici in grado di attivare i TLR, soprattutto in associazione all' IFN γ . L'iNOS catalizza la conversione dell'arginina in citrullina liberando in tal modo ossido nitrico gassoso diffusibile. All'interno dei fagolisosomi l'ossido nitrico potrebbe combinarsi con il perossido di idrogeno o con il superossido generato dall'ossidasi fagocitaria, per produrre radicali perossinitrito altamente reattivi, in grado di eliminare i microrganismi. La funzionalità ridondante e cooperativa dei ROI e dell'NO è dimostrata dal fatto che i topi knockout privi sia dell'iNOS che dell'ossidasi fagocitaria sono più suscettibili alle infezioni batteriche rispetto ai knockout per i singoli geni (Abbas A.K. et al., 2003). Grazie a

questo meccanismo i neutrofili e i macrofagi sono in grado di distruggere protozoi quali *Toxoplasma gondii*: in particolare, è stato studiato come l'effetto dell'IFN γ su questo protozoo si attui attraverso la stimolazione della produzione di iNOS e di NO da parte di macrofagi e neutrofili. NO non solo è direttamente toxoplasmicida, ma ha anche un ruolo nel favorire la trasformazione da tachizoita a bradizoita mediante l'inibizione della respirazione mitocondriale (Langermans J.A.M. et al., 1992). Anche nelle infezioni da *Leishmania major* nel modello murino è stato dimostrato il ruolo dell'iNOS: topi knock out per questo enzima sono risultati più suscettibili all'infezione da parte del protozoo rispetto ai soggetti wildtype. È stato inoltre dimostrato che le principali molecole di superficie di *Leishmania* (i glicolipidi, i glicoinositolfosfolipidi e il lipofosfoglicano – LPG) oltre ad essere altamente conservate sono anche forti inibitori della sintesi di NO; va sottolineato che l'LPG stesso, mediante l'inibizione della sintesi di IL-12 è in grado di bloccare anche indirettamente l'induzione dell'iNOS (Liew F.Y. et al., 1997).

I neutrofili ed i macrofagi attivati producono anche numerosi enzimi proteolitici all'interno dei fagolisosomi, dotati di funzione antimicrobica. Uno degli enzimi più importanti dei neutrofili è l'elastasi, una serin proteasi ad ampio spettro necessaria alla distruzione di numerosi tipi di batteri. È stato dimostrato che l'elastasi dei neutrofili è coinvolta nell'attivazione dei macrofagi in grado di conferire potenziale leishmanicida a questi ultimi mediante l'interazione con TLR4 (Ribeiro-Gomes F.L. et al., 2007).

Il ruolo dei neutrofili nelle infezioni parassitarie – Tradizionalmente il ruolo dei neutrofili nelle malattie parassitarie era considerato di secondaria importanza. Recentemente è stato dimostrato che la fagocitosi di neutrofili senescenti (apoptotici) può esacerbare o indurre l'eliminazione di *Leishmania major* a seconda del background genetico. È noto infatti che la fagocitosi dei neutrofili da parte del macrofago è seguita dalla inattivazione del macrofago stesso. Nei topi BALB/c infetti con *L. major* i segnali apoptotici dei neutrofili intervengono prima dell'attivazione dei macrofagi, causando così un'esacerbazione dell'infezione. Nei topi B6 (resistenti) prima dell'espressione dei recettori di clearance (segnali di apoptosi, gli stessi responsabili dell'inattivazione macrofagica) i neutrofili secernono grosse quantità di elastasi (come sopra accennato), che mediante l'attivazione di TLR4 permette lo sviluppo e la secrezione di TNF α e di

ROS (Ribeiro-Gomes F.L. et al., 2006, 2007). A confermare l'importanza del polimorfismo genetico nell'interazione macrofago-neutrofilo è stato dimostrato che nelle infezioni da *T. cruzi* nel topo gli stessi tipi genetici si collocano in posizioni opposte: i BALB/c sono resistenti, i B6 sono suscettibili (Chen L. et al., 2001). La cooperazione tra i neutrofili ed i macrofagi, aspetto ritenuto sempre più importante nell'ambito della difesa nei confronti di patogeni intracellulari, avviene su più piani: i neutrofili, una volta fagocitati dai macrofagi, possono trasferire ai macrofagi delle molecole ad attività anti-microbica; i neutrofili infetti vengono inoltre fagocitati dai macrofagi che in tal modo possono portare a termine l'eliminazione dei patogeni che il neutrofilo stesso non era riuscito ad eliminare (Ribeiro-Gomes F.L. et al., 2006). Sempre nel modello murino – ma in questo caso impiegando *L. infantum*, il trattamento con anticorpi monoclonali anti-neutrofili ha permesso di dimostrare che i neutrofili sono necessari soprattutto nelle fasi precoci dell'infezione, mentre una loro deplezione protratta nel tempo non influenza il decorso dell'infezione (Rousseau D. et al., 2001). Anche per altri protozoi è stata dimostrata l'importanza dei neutrofili; analogamente a quanto riportato per *L. infantum*, anche nel corso dell'infezione con *T. gondii* (sempre nel modello murino) la deplezione dei neutrofili mediante anticorpi monoclonali ha permesso di dimostrare un ruolo fondamentale dei polimorfonucleati nei primi giorni di infezione. In questo caso si ritiene che i neutrofili possano indirizzare positivamente la risposta immunitaria e controllare la replicazione dei tachizoiti (Bliss S.K. et al., 2001).

2.3 – Le cellule Natural Killer (NK).

Le cellule NK sono una sottopopolazione di linfociti in grado di eliminare le cellule infette e le cellule che hanno perso l'espressione dell'MHCI; secernono citochine, soprattutto IFN γ . Il principale ruolo fisiologico delle NK è la difesa nei confronti delle infezioni virali e di altri microrganismi intracellulari. Il termine natural killer deriva dal fatto che se queste cellule vengono isolate dal sangue o dalla milza, sono in grado di uccidere diversi tipi di cellule senza che sia necessaria una ulteriore attivazione (al contrario i linfociti T CD8+ necessitano di essere attivati prima di poter essere differenziati in linfociti T citotossici – CTL, in grado di eliminare i loro bersagli). Le NK derivano da precursori del midollo osseo e hanno l'aspetto di grossi linfociti dotati

di numerose granulazioni citoplasmatiche, per cui talvolta vengono definite come linfociti granulari. Sulla base del fenotipi di superficie e della loro linea di derivazione, le NK non appartengono ai linfociti né T né B e non esprimono recettori derivanti da ricombinazione somatica, distribuiti in maniera clonale, quali le immunoglobuline o i T cell receptors. Le NK sono tra il 5 ed il 20% delle cellule mononucleate del sangue e della milza e sono rare in altri organi (Abbas A.K. et al., 2003). Le cellule NK svolgono anche un ruolo importante nelle infezioni protozoarie: è stato infatti dimostrato che le cellule NK possono riconoscere ed eliminare epimastigoti e tripomastigoti di *T. cruzi* e di *T. lewisi* in vitro; inoltre, è stato anche dimostrato che tali cellule sono in grado di eliminare i globuli rossi infetti da plasmodi per contatto diretto cellula-cellula (Papazahariadou M et al., 2007).

Riconoscimento delle cellule infette da parte delle NK – L'attivazione delle NK è regolata da un bilancio tra i segnali prodotti dai recettori di attivazione e quelli di inibizione. Tali recettori sono composti da catene responsabili dell'adesione dei ligandi e catene attive (effettrici). I ligandi dei recettori di attivazione non sono ben definiti ma potrebbero essere molecole espresse comunemente sulle superfici di numerose cellule e dei prodotti microbici. I recettori inibitori si legano ai recettori MHCI self, espresse dalla maggior parte delle cellule (Carayannopoulos L.N. et al., 2004).

Le cellule NK riconoscono anche bersagli ricoperti di anticorpi mediante il FcγRIIIa (CD16), un recettore a bassa affinità per la frazione costante (Fc) degli anticorpi IgG1 e IgG3. Come conseguenza di questo riconoscimento le cellule NK eliminano le cellule bersaglio ricoperte dagli anticorpi. Questo processo, denominato citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), è uno dei principali meccanismi effettori dell'immunità umorale anche in ambito parassitologico (Attallah A.M. et al., 1980).

La replicazione e le attività delle cellule NK sono stimulate da citochine, in particolare da IL-15 e IL-12. L'IL-15, che viene prodotta dai macrofagi e da altri tipi cellulari, è un fattore di crescita per le cellule NK, come si è dimostrato in un esperimento condotto su topi carenti di IL-15 o dei suoi recettori e che di conseguenza presentavano un bassissimo numero di cellule NK. La citochina IL-12 è un potente induttore di produzione di IFN γ da parte delle cellule NK e questa funzione viene incrementata

dall'IL-18. Gli IFN di tipo I, IFN α e IFN β stimolano anch'essi il potenziale citolitico delle cellule NK, probabilmente aumentando l'espressione dei recettori a IL-12. Alte concentrazioni di IL-2 possono stimolare l'attività delle cellule NK, che tramite questa citochina possono rendersi parte attiva nell'immunità acquisita cellulo-T mediata (Abbas A.K. et al., 2003).

Funzioni delle cellule NK – La funzione delle cellule NK è di distruggere le cellule infette e di attivare i macrofagi in modo che questi eliminino i microrganismi fagocitati. Le cellule NK hanno al loro interno dei granuli che contengono una proteina chiamata perforina, la cui funzione è creare dei pori nella membrana delle cellule bersaglio, attraverso i quali penetrano degli enzimi chiamati “granzymes”, anch'essi contenuti nelle cellule NK e che inducono apoptosi delle cellule bersaglio. Distruggendo le cellule infettate da virus e patogeni intracellulari le cellule NK eliminano i reservoir di infezione (Abbas A.K. et al., 2003).

Le cellule NK svolgono un ruolo importante nella difesa contro i microrganismi intracellulari. Esse distruggono le cellule infettate da virus prima che i CTL antigene specifici possano diventare pienamente attivi, ovvero nei primi giorni post-infezione, sotto la stimolazione operata da IL-12 e IL-15. La reazione macrofagica all'interferone prodotto dalle cellule NK può controllare un'infezione da parte di un organismo intracellulare per un periodo di diversi giorni, addirittura di settimane e in questo modo permettere all'immunità T cellulo-mediata di svilupparsi e di eradicare l'infezione.

Le cellule NK hanno un ruolo attivo nella difesa contro le infezioni da protozoi, sia attraverso la distruzione diretta del parassita, dimostrata sperimentalmente utilizzando tachizoiti extracellulari di *Toxoplasma gondii*, sia distruggendo le cellule dell'organismo ospite infettate, ipotesi supportata da esperimenti che prevedevano l'utilizzo di cellule infette da *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* (Scharton-Kersten T.M. et al., 1997; Korbel D.S. et al., 2001).

Ulteriori esperimenti hanno dimostrato come le cellule NK siano alla base della resistenza precoce alla leishmaniosi; il decorso della patologia dovuta a *Leishmania major* è infatti più grave in topi che presentano una deplezione di NK (Laskay T. et al., 1993) e la parassitemia dovuta a *Leishmania amazoniensis* non può essere controllata in assenza di cellule NK (Laurenti M.D. et al., 1999). In effetti, si suppone che la funzione

delle cellule NK in corso di leishmaniosi sia mediata dall'azione delle citochine, piuttosto che direttamente citotossica. In accordo con questa ipotesi, è stato dimostrato che la rapida produzione di IFN γ durante le prime ore ed i primi giorni di infezione da parte di *Leishmania major* sia cruciale per la sopravvivenza dell'organismo e che le cellule NK siano la fonte iniziale di questa citochina (Scharton-Kersten T.M. et al., 1997). In aggiunta a questo, è stato studiato come i topi con una popolazione normale di cellule NK e in assenza di cellule T siano in grado di contenere l'infezione da *L. major* nei linfonodi distrettuali, dimostrando così l'esistenza di un meccanismo indipendente dalle cellule T per limitare la diffusione del parassita (Laskay T. et al., 1995). Allo stesso modo, la guarigione spontanea e la protezione dalla leishmaniosi umana sembrano essere associate alla capacità di rispondere all'infezione da *Leishmania aethiopica* con una rapida proliferazione cellulare e secrezione di citochine (Maasho K. et al., 1998).

2.4 – Il sistema complemento.

Il sistema complemento consiste di diverse proteine plasmatiche che sono attivate da patogeni e promuovono la loro distruzione e il processo infiammatorio. Il riconoscimento dei microrganismi da parte del complemento può seguire tre vie: quella classica, così chiamata perché è stata la prima ad essere scoperta, sfrutta una proteina plasmatica chiamata C1 per individuare anticorpi IgM, IgG1 o IgG3 legati alla superficie dei patogeni. La via alternativa, che fu scoperta successivamente ma è filogeneticamente più vecchia della via classica, prevede il riconoscimento diretto di alcune strutture microbiche di superficie e può essere quindi ascrivibile all'immunità innata. La terza via o via "lectinica" è dovuta ad una proteina plasmatica chiamata lectina legante il mannosio (mannose-binding lectin, MBL, già citata in precedenza) che riconosce i residui terminali di mannosio sulle glicoproteine e glicolipidi batterici. La MBL legata ai microrganismi attiva una delle proteine della via classica, in assenza di anticorpi, con l'associazione di serin-proteasi. Il riconoscimento dei patogeni mediante le tre vie prevede l'arruolamento sequenziale e l'assemblamento di proteine del complemento addizionali per formare complessi con la funzione di proteasi. A partire da C3, la proteina centrale del complemento, vengono attivate numerose altre proteine:

alcune (ad esempio C3b) fungono da proteasi vere e proprie e permettono l'attivazione e la prosecuzione della cascata del complemento, altre (C5b-C9) vanno a formare un complesso molecolare a funzione di poro di membrana, diretto responsabile della lisi dei patogeni e altre ancora (C3a, C5a) fungono da stimolo chemiotattico per i neutrofili (Abbas A.K. et al., 2003). Le cellule dei mammiferi esprimono diverse proteine regolatorie che bloccano l'attivazione del complemento prevenendo in questo modo eventuali danni. Oltre al ruolo che svolge nell'immunità innata, l'attivazione del complemento e le proteine che lo compongono hanno molte altre funzioni. In particolare, il complemento funge da 'ponte' fra l'immunità innata e quella acquisita potenziando l'infiammazione ed aumentando la risposta immunitaria. Inoltre è stato suggerito che il complemento possa essere coinvolto in altri processi biologici non infiammatori, come la riproduzione e la morfogenesi durante lo sviluppo embrionale. Recentemente, l'inizio della decifrazione di alcuni genomi parassitari ha permesso di scoprire nuove omologie tra le proteine dei parassiti e quelle degli organismi ospiti. Queste proteine possono essere recettori per fattori di crescita, citochine od ormoni dell'organismo ospite, e sta diventando sempre più chiaro che le interazioni fra tali fattori dell'ospite e le strutture (recettori) del parassita mediano importanti processi biologici nei parassiti. Le proteine del complemento, allo stesso modo, interagiscono con i parassiti ed è stato ipotizzato che possano mediare il loro sviluppo fisiologico (Inal J.M., 2004). In studi precedenti è stato identificato sulla superficie del trematode *Schistosoma*, specificamente a livello di pori e canali sul tegumento repleti di sangue dell'organismo ospite, il recettore CRIT (Complement C2 receptor inhibitor Trispanning) (Inal J.M., 1999). Questo è stato osservato sia nello stadio larvale, subito dopo l'infezione, che nei parassiti adulti, ma è espresso in misura maggiore nelle uova (Hu W. et al., 2003).

2.5 – Le cellule dendritiche (DC).

Le cellule dendritiche, distribuite in tutto l'organismo, sono cellule presentanti l'antigene (antigen presenting cells, APC) la cui principale caratteristica è la capacità di stimolare i linfociti T naïve, dando in questo modo inizio alla risposta immunitaria acquisita. Devono il loro nome alla morfologia stellata che le caratterizza. Tale

morfologia è dovuta alle proiezioni citoplasmatiche che consentono la loro interazione con le cellule circostanti. Ad esempio le cellule di Langherans, localizzate nell'epidermide, pur essendo l'1% della popolazione cellulare di quel distretto, riscono a estendersi per il 25% della superficie cutanea dell'organismo dei mammiferi (vedi Figura 1) (Abbas A.K. et al., 2003). Oltre che nelle superfici esterne (tra le quali si possono includere anche la faringe, il primo tratto dell'esofago, la vagina, la cervice esterna e l'ano) le DC sono anche presenti in grande numero anche nelle mucose degli apparati respiratorio e digerente, a conferma del loro ruolo di sentinelle dell'organismo (Steinman R.M. et al., 2007). Durante il loro ciclo vitale queste cellule sono caratterizzate da diversi fenotipi collegati a specifiche attività, non ancora completamente definite. Tutte le cellule dendritiche immature sono in grado di catturare e processare gli antigeni, ma, una volta mature, vengono distinte in sottotipi a seconda del tipo di risposta che inducono (Reid S. D. et al., 2000).

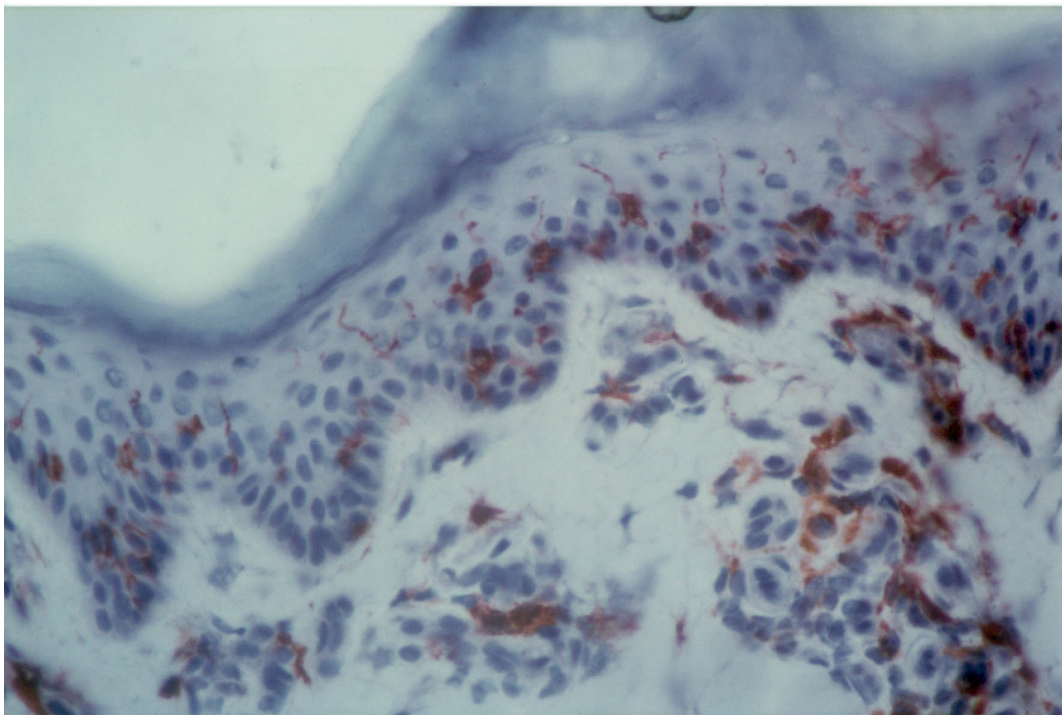


Figura 1. Marcatura immunoistochimica anti-CD1a su cute di maiale. Si può osservare la distribuzione intraepidermica delle DC e la notevole estensione dei dendriti (10x).

Tradizionalmente sono state identificate due linee di sviluppo delle cellule dendritiche: una linea mieloide, in comune con i fagociti, e una linea linfoide/plasmacitoide, in

comune con i linfociti T (Vandenabeele S. et al., 1999). Le cellule dendritiche mieloidi (mDC *Myeloid Dendritic Cells*) e linfoidi (IDC, Lymphoid Dendritic Cells o pDC, Plasmacytoid Dendritic Cells) differiscono per fenotipo, localizzazione e funzione. Sono distinguibili grazie al marker CD8 α , presente sulle pDC, ma assente sulle mDC. Le mDC catturano gli antigeni in periferia e successivamente migrano negli organi linfoidi dove presentano gli antigeni, processati ed esposti sulla loro superficie cellulare, per dare inizio alla risposta immunitaria acquisita; le pDC sono localizzate nel timo e nei linfonodi e sono prevalentemente implicate nell'acquisizione dell'immunosoppressione. Nonostante la loro differente origine, hanno un sistema di processazione degli antigeni simile (Yao V. et al., 2002). Sembra che questi due tipologie di DC siano coinvolte anche nel tipo di risposta immunitaria con cui l'organismo risponde anche nei confronti dei patogeni infettivi, compresi i parassiti. Le cellule dendritiche nel momento in cui stimolano le cellule T forniscono a questi ultimi 3 segnali: il primo segnale è mediato dal contatto con l'antigene esposto nel contesto delle molecole di MHCII; il secondo segnale agisce mediante l'interazione tra i recettori costimolatori quali CD40 e CD80/86 e i loro rispettivi ligandi sui linfociti T. Il terzo segnale è in grado di polarizzare il tipo di risposta delle cellule Th naïve. Tale segnale è mediato da parte di numerose molecole libere o di membrana, così come da diverse citochine (ad esempio, IL12 e IL-18). L'espressione del terzo segnale è dettata dalle condizioni in cui le DC vengono attivate.

Alcune molecole appartenenti ai patogeni possono promuovere la generazione di DC in grado di produrre IL-12 in seguito alla loro attivazione; queste DC, probabilmente sovrapponibili alle mDC, vengono definite cellule dendritiche di tipo 1, DC1 e la loro secrezione di IL-12 evoca una risposta di tipo Th1. Per contro, altre sostanze appartenenti agli organismi patogeni possono stimolare le DC a produrre le citochine IL1, IL-6 e IL-4. Queste citochine stimolano preferenzialmente il braccio Th2 della risposta immunitaria, mentre le cellule dendritiche responsabili della produzione di IL-4 sono definite DC2, e da taluni sono state considerate sinonimo di pDC (Tizard I., 2004). Nonostante non si conoscano ancora bene i precursori di queste due tipologie di DC (DC1 e DC2) – al punto che esistono due teorie in merito (l'una che ipotizza l'esistenza di un unico precursore midollare che si differenzia in seguito, l'altra che ipotizza l'esistenza di due linee di derivazione diverse già a livello delle DC immature) è chiaro

come sia fondamentale, per l'indirizzare la risposta verso il tipo Th1 o Th2, la tipologia di antigeni incontrati (Shortman K. et al., 2002; Tizard I., 2004). È probabile che ancora una volta siano coinvolti i TLR. Infatti che TLR4 è espresso sulle mDC mentre TLR9 è invece espresso sulle pDC, e ciò ovviamente fa sì che i rispettivi ligandi di questi TLR siano in grado di attivare un sottotipo piuttosto che un altro (Tizard I., 2004). Un altro potenziale fattore in grado di indurre una risposta Th1 o Th2 sembra essere la dose dell'antigene incontrato, oltre alla sua tipologia. Anche il microenvironment in cui avviene l'incontro con l'antigene, come già accennato, svolge un ruolo fondamentale: le DC intestinali e delle vie respiratorie tendono a produrre preferenzialmente IL-4 e a portare quindi la risposta immunitaria nella direzione Th2 (Tizard I., 2004).

In molti tessuti le cellule dendritiche sono presenti in uno stato definito "immaturo", in cui sono incapaci di stimolare le cellule T. Cellule dendritiche immature sono presenti anche nel sangue insieme ai precursori dei macrofagi dove costituiscono differenti popolazioni di monociti, distinguibili per fenotipo, morfologia e funzione. Queste cellule migrano in tessuti non linfoidi in risposta a stimoli antigenici. Il loro reclutamento richiede l'interazione con l'endotelio vascolare e la matrice extracellulare attraverso molecole di adesione e stimoli chemotattici; queste esprimono infatti sulla loro superficie molecole d'adesione e recettori delle chemochine (CCR) che indirizzano la migrazione cellulare (Dieu-Nosjean M. C. et al., 1999).

Le cellule dendritiche immature hanno una notevole quantità di molecole MHCII (*Major Histocompatibility Complex class II*) nei loro compartimenti intracellulari (MIIC).

Perché la risposta immunitaria adattativa si sviluppi è necessario che le cellule dendritiche catturino gli antigeni, convertano le proteine in peptidi, associno questi ultimi a molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) e che infine espongano i complessi Ag-MHC sulla loro superficie cellulare (primo segnale per i linfociti T).

Il processo di incorporazione degli antigeni, caratteristico delle DC immature, può avvenire per pinocitosi, endocitosi e fagocitosi, a seconda che si tratti di ingestione di fluidi extracellulari o di materiale opsonizzato, o ancora (per la fagocitosi) di frammenti apoptotici o necrotici (Clark G.J. et al., 2000; Fanger N. A. et al., 1997; Albert M. L. et al., 1998). Gli antigeni catturati vengono processati e presentati in associazione alle

molecole MHC di classe I o di classe II. Solitamente gli antigeni endogeni, come i patogeni intracellulari, sono processati in peptidi di otto-dieci amminoacidi e legati a molecole MHC di classe I di nuova sintesi all'interno del reticolo endoplasmatico. I complessi peptide- MHC di classe I vengono esposti sulla superficie cellulare e quindi riconosciuti da recettori presenti sulla superficie dei linfociti T CD8+, che avviano una risposta immunitaria cellulare di tipo litico.

La maturazione delle cellule dendritiche induce un rapido e transitorio incremento nella sintesi delle molecole MHC di classe II, le quali subiscono anche un aumento notevole della loro emivita responsabile dell'attivazione dei linfociti per molti giorni (Cella M et al., 1997). Le cellule dendritiche mature stoccano complessi peptide-MHC di classe II in vescicole intracellulari (vedi Figura 2) contenenti molecole costimolatorie delle cellule T, che migrano insieme ai complessi peptide MHC di classe II sulla superficie cellulare (secondo segnale). Sulla membrana delle cellule le molecole MHC e le particelle costimolatorie formano un *cluster* che viene riconosciuto dalle cellule T CD4+ (Turley S. J. et al., 2000). Tipicamente nelle cellule dendritiche la presentazione dell'antigene attraverso la formazione di complessi Ag-MHCII avviene per antigeni esogeni internalizzati per fagocitosi. Recentemente è stato dimostrato che anche antigeni endogeni presenti nel citosol e nel nucleo delle APC possono dare luogo alla presentazione degli antigeni attraverso le molecole MHC di classe II in seguito ad un processo chiamato autofagia (Schmid D. et al., 2006).

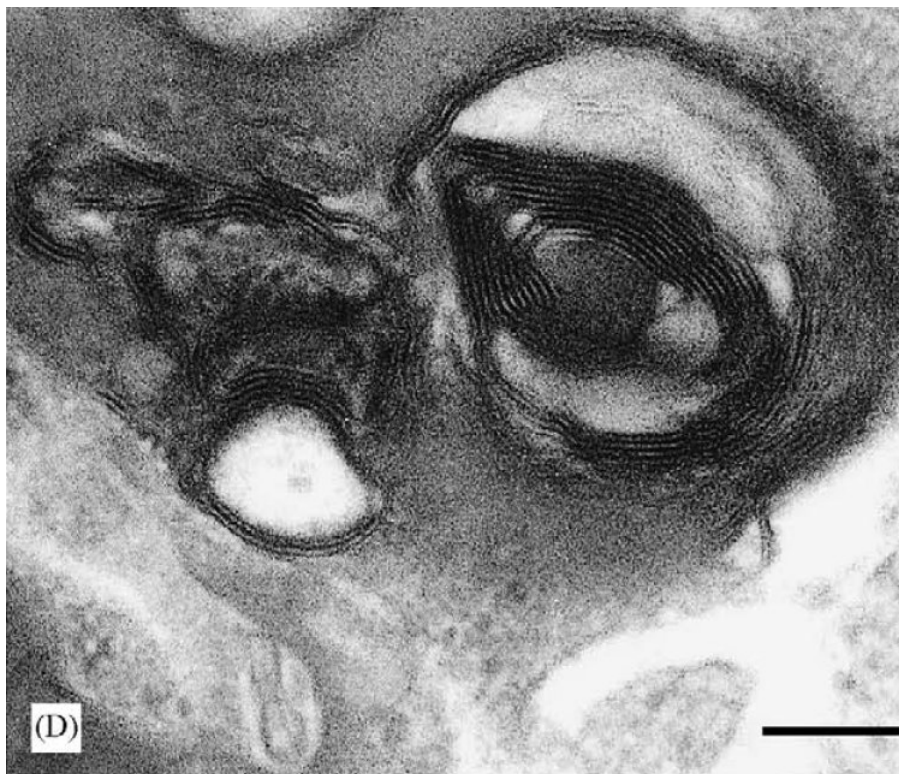


Figura 2. Strutture vescicolari multilaminari caratteristiche dei comparti MHCII. In questo caso si tratta di cellule dendritiche di cane stimulate alla maturazione mediante antigene di *Leishmania infantum* (barra 0,1µm). Modificato da Sacchi L. et al., 2006.

Una volta che le cellule dendritiche hanno catturato gli antigeni, migrano verso gli organi linfoidi ove li presentano alle cellule del sistema immunitario. Gli stimoli alla maturazione delle cellule dendritiche provenienti dall'interazione con i batteri e con altri patogeni, così come i recettori coinvolti (TLR), sono già stati accennati. Contemporaneamente alla maturazione, viene stimolata la migrazione verso i tessuti linfoidi secondari, attraverso il sangue o la linfa. Durante questa migrazione, gli antigeni catturati dalle cellule dendritiche vengono mantenuti stoccati in uno speciale compartimento intracellulare (Lutz M. B. et al., 1997)

La migrazione delle cellule dendritiche è accompagnata da cambiamenti nella loro capacità di risposta alle chemochine (Sozzani S. et al., 1998), fenomeno almeno in parte in grado di spiegare la migrazione verso i tessuti linfoidi (ad esempio, si assiste all'upregulation di CCR7, recettore per le chemochine dei tessuti linfoidi secondari). Una volta maturate e giunte agli organi linfoidi secondari si assiste alla già citata attivazione dei linfociti mediante i tre segnali.

Rapporti più dettagliati sull'interazione tra le DC e i protozoi oggetto della presente tesi sono presenti nei rispettivi capitoli (3 e 4).

2.6 – Le citochine che mediano e regolano la risposta immunitaria innata.

Tumor Necrosis Factor – TNF

È il mediatore principale della risposta infiammatoria ai batteri gram-negativi. Fonte principale di TNF sono i fagociti mononucleari attivati, ma anche i linfociti T attivati da antigeni, le cellule NK e le mast-cells possono produrre questa citochina. La principale funzione biologica di TNF è di stimolare l'arrivo di neutrofili e monociti verso il sito di infezione e di attivarli in modo da eradicare l'infezione. Ha inoltre effetti su diversi distretti: sull'ipotalamo dove porta ad un aumento di temperatura (febbre), sul fegato, dove stimola la produzione di proteine della fase acuta, causa una virata verso il catabolismo da parte del tessuto muscolare ed adiposo e l'apoptosi di molti tipi cellulari. Nelle gravi infezioni il TNF viene prodotto in grandi quantità e causa ripercussioni sistemiche (shock endotossico) (Clark I.A., 2007).

Interleuchina 1 – IL-1

La funzione principale dell'IL-1 è di mediare la risposta infiammatoria alle infezioni e ad altri stimoli lesivi. La maggior fonte cellulare di IL-1 sono i fagociti mononucleati attivati e la produzione è indotta dalla presenza di LPS e di altre citochine come TNF. Altre cellule come neutrofili, cellule endoteliali ed epiteliali producono IL-1. Gli effetti biologici di IL-1 sono simili a quelli di TNF e dipendono dalla quantità di citochina prodotta: gli effetti sono solo infiammatori e locali se presente in piccole quantità, sono anche di tipo sistemico ormonale se IL-1 viene secreta in grandi quantità (Abbas A.K. et al., 2003).

Interleuchina 6 – IL-6

IL-6 ha una funzione sia nell'immunità innata che in quella acquisita. E' sintetizzata da fagociti mononucleati, da cellule dell'endotelio vascolare, dai fibroblasti ed altre cellule in risposta alla presenza di patogeni o di altre citochine, in particolare IL-1 e TNF. IL-6

stimola la sintesi di proteine della fase acuta da parte degli epatociti e contribuisce agli effetti sistemici dell'inflammation; stimola la produzione di neutrofili dai progenitori nel midollo osseo ed è in grado di stimolare la crescita di linfociti B già differenziati in produttori di anticorpi. Per quanto riguarda queste tre citochine (TNF, IL-1 e IL-6), ad esempio, è stato descritto come la loro azione combinata possa evocare fenomeni (febbre, leucocitosi e produzione di proteine della fase acuta, tra cui la proteina C reattiva) che costituiscono di fatto le prime reazioni dell'ospite all'infezione da parte di protozoi e che di conseguenza indirizzano tutte le risposte immunitarie successive (Titus R.G. et al., 1991).

Interleuchina 12 – IL-12

IL-12 è il mediatore principale della risposta immunitaria innata precoce ai microrganismi intracellulari ed è l'induttore chiave dell'immunità cellulo mediata, la risposta immunitaria acquisita più efficace nei confronti di questo tipo di patogeni. La sua fonte principale sono i fagociti mononucleari attivati e le cellule dendritiche, in risposta a stimoli diversi, quali LPS o l'infezione virale o da parte di patogeni intracellulari. IL-12 stimola la produzione di IFN γ da parte delle cellule NK e dei linfociti T; permette la differenziazione dei linfociti T helper CD4+ in cellule TH1 in grado di produrre IFN γ ; accresce le funzioni citolitiche delle cellule NK attivate e dei CTL. Tutti questi effetti sono stati anche ben approfonditi nell'ambito, ad esempio, dell'infezione da *T. gondii* (Sher A. et al., 2003; vedi Capitolo 3 – cellule dendritiche e *T. gondii*).

Interferoni di tipo 1

Gli IFN di tipo 1 (IFN α e IFN β) mediano la risposta immunitaria innata precoce alle infezioni virali, pertanto attualmente non sembrano rivestire particolare importanza nell'immunopatogenesi delle malattie parassitarie.

Interleuchina 10 – IL-10

IL-10 è un inibitore dei macrofagi attivati e delle cellule dendritiche ed è quindi coinvolta nel controllo delle reazioni immunitarie innate e dell'immunità cellulo-mediata. IL-10 è prodotta dagli stessi macrofagi attivati ed è pertanto un esempio di regolatore a

feedback negativo. Altre cellule che secernono IL-10 sono i linfociti T ed altre cellule non linfoidi, come ad esempio i cheratinociti. L'IL 10 inibisce la produzione di IL-12 e l'espressione di costimolatori e molecole MHC di classe II da parte delle cellule dendritiche e dei macrofagi. Nell'ambito della patogenesi della leishmaniosi viscerale umana IL-10 sembra avere un ruolo centrale; si è infatti ipotizzato che tale citochina operi per tentare di mantenere l'omeostasi dell'organismo controllando lo status di infiammazione persistente indotto dall'infezione (Nylén S. et al., 2007).

Interleuchina 15 – IL-15

IL-15 è prodotta da fagociti mononucleati e molti altri tipi cellulari in risposta a infezioni virali, alla presenza di LPS o a qualsiasi altro evento che stimoli la risposta immunitaria. La funzione meglio documentata di questa citochina è la stimolazione della proliferazione di cellule NK, soprattutto nei primi momenti che seguono l'instaurarsi di una infezione virale. Altra funzione è quella di fattore di crescita e sopravvivenza per le cellule T CD8+ (McInnes I.B. et al., 2003). IL-15 è stata ritenuta responsabile dell'attivazione delle cellule NK anche nella criptosporidiosi umana; queste ultime a loro volta provocano la lisi degli enterociti infettati da *Cryptosporidium* e portano alla clearance dell'infezione (Dann S.M. et al., 2005).

Interleuchina 18 – IL-18

E' prodotta dai macrofagi in risposta a LPS o alla presenza di altri derivati batterici. Stimola la produzione di IFN γ da parte delle cellule NK e T, in sinergia con IL-12. Sono state identificate molte altre citochine attraverso informazioni ottenute dalla sequenziamento del DNA, le cui funzioni biologiche devono essere ancora esplorate (e probabilmente anch'esse sono in qualche misura coinvolte nell'immunità innata). Si parla ad esempio di IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24, che parrebbero essere omologhe dell'IL-10. L'IL-21, omologa all'IL-15, stimola la proliferazione di cellule NK, mentre IL-23 stimolerebbe la risposta cellulo-mediata (Abbas A. K. et al., 2003).

3 - CICLO BIOLOGICO, PATOGENICITÀ E RISPOSTA IMMUNITARIA A *NEOSPORA CANINUM*

Neospora caninum, protozoo del Phylum Apicomplexa, è stato scoperto nel 1984 (Bjerkås et al., 1984) (anche se è stato riconosciuto come nuova specie solo nel 1988) come responsabile prima di gravi forme neurologiche nel cane e, poco dopo, come agente abortigeno nella specie bovina. Data la sua forte somiglianza con *Toxoplasma gondii*, è dimostrato come prima della sua scoperta forme cliniche compatibili con la neosporosi venissero descritte come forme di toxoplasmosi (Dubey J.P., 2003). I maggiori sforzi della ricerca nel campo della neosporosi sono oggi concentrati, a causa dell'importanza economica, sulla specie bovina, ed in particolare sulla patogenesi dell'aborto e sulla possibile introduzione di strumenti immunizzanti efficaci. In entrambe i casi, le conoscenze indispensabili riguardano il rapporto tra l'ospite e il parassita.

3.1 – Il parassita.

Sebbene dimostrata solamente molto dopo la scoperta di *N. caninum*, era stata sin da subito postulata per questo parassita una natura assimilabile ai coccidi, ed in particolare a *Toxoplasma gondii*. Pertanto, gli stadi del parassita (ad oggi osservati) sono l'oocisti, il tachizoita ed i bradizoiti (all'interno di cisti tissutali). A causa della bassa efficienza del ciclo intestinale, non sono ancora stati descritti gli stadi intestinali che si ritiene siano simili a quelli già descritti in *T. gondii* nella specie felina. Le oocisti, solo raramente osservate in corso d'infezione naturale, sono quasi sferiche, con un diametro di 11µm, e una volta sporulate hanno il tipico aspetto delle oocisti della famiglia Sarcocystiidae, con due sporocisti contenenti ciascuna 4 sporozoiti (Dubey J.P., 2003). I tachizoiti, intracellulari, sono allungati e misurano 6x2µm, e a livello ultrastrutturale possiedono tutti gli organelli necessari per l'invasione e la sopravvivenza all'interno delle cellule (roptri, micronemi e granuli densi) e per la loro replicazione ed esigenze metaboliche (nucleo, apparato di Golgi, mitocondri...) (Hemphill A. et al., 2004). I bradizoiti, infine, contenuti in cisti rotonde od ovali con un diametro fino a 107µm e una

parete spessa 4µm, sono simili per forma e strutture ai tachizoiti (sebbene dal punto di vista antigenico ne siano ben differenziabili) e misurano 7-8x2µm (Dubey J.P., 2003; Dubey J.P. et al., 2002).

3.2 – Ciclo biologico.

Il ciclo biologico di *N. caninum*, al pari di quello di *T. gondii*, è complesso, ma è molto meno noto nei dettagli (vedi Figura 3). L'ospite definitivo (cane e coyote sono gli unici individuati) rilascia nell'ambiente le oocisti non sporulate; nell'ambiente esterno avviene pertanto la sporulazione. Le oocisti sporulate sono infettanti per gli ospiti intermedi (che rispetto a *T. gondii* sono in numero molto inferiore, principalmente bovino, cane, pecora, capra, cavallo e topo). L'infezione orizzontale di un ospite immunocompetente solitamente non causa malattia ma gli sporozoiti fuorisciti dall'ocisti – così come gli altri stadi infettanti (bradizoiti e tachizoiti), in analogia a quanto accade per *T. gondii*, si presume siano in grado di infettare l'intestino, attraversare l'epitelio, raggiungere i vasi sanguigni e linfatici e infettare altre cellule nucleate, tra cui i macrofagi e i linfociti (Dubey J.P., 2003). Nelle prime fasi dell'infezione i parassiti si disseminano attraverso l'organismo e si trasformano nello stadio a rapida replicazione, i tachizoiti. Gli organi maggiormente interessati dalla replicazione parassitaria comprendono il sistema nervoso centrale, i muscoli e l'apparato riproduttore (è in queste localizzazioni che il parassita può causare le principali forme cliniche). In questa fase (definita fase acuta) i tachizoiti, essendo stadi intracellulari, invadono numerose tipologie cellulari in maniera attiva, e si replicano all'interno delle cellule infette fino a causarne la lisi, per poi reinfectare altre cellule (ciclo litico) (Hemphill A. et al., 2006). Successivamente, si ritiene che lo stress causato dalla risposta immunitaria dell'ospite sia uno dei fattori che spingono il parassita alla conversione nello stadio a lenta replicazione, i bradizoiti (Buxton D. et al., 2002). I bradizoiti rappresentano lo stadio quiescente del parassita, che dà luogo alla formazione di cisti intracellulari circondate dalla parete della cisti stessa che protegge il parassita dalle reazioni fisiologiche e immunologiche dell'ospite. Tali cisti sono state identificate quasi esclusivamente all'interno del sistema nervoso centrale, con poche eccezioni (Peters M. et al., 2001). I bradizoiti possono sopravvivere in un ospite

immunocompetente con infezione latente per molti anni, forse per tutta la vita dell'ospite, senza causare forme cliniche. Si tratta della fase cronica o latente, che gioca un ruolo centrale sia nella patogenesi delle turbe riproduttive nel bovino, sia nelle diverse vie di trasmissione del parassita: verticale (la riattivazione in gravidanza, come sarà descritto in seguito, permette il passaggio del parassita alla progenie) ed orizzontale (si ritiene che la principale fonte di infezione per i canidi ospiti definitivi e per i carnivori ospiti intermedi sia l'ingestione di bradizoiti all'interno di cisti tissutali) (McAllister M.M et al., 1998; Lindsay D.S. et al, 1999a, 1999b; Dijkstra T. et al., 2001; Schares G. et al., 2001; Gondim L.F.P. et al., 2002). Quando infatti l'ospite, il bovino in particolare, va incontro a una gravidanza, i bradizoiti possono riattivarsi e lo status di parziale immunocompetenza della madre gravida, vale a dire una diminuzione della risposta Th1 a favore di quella Th2, porta a un abbassamento dell'immunità cellulo-mediata, responsabile del controllo e dell'inibizione della replicazione dei tachizoiti. Questo fenomeno contribuisce alla riattivazione dei bradizoiti e alla loro riconversione a tachizoiti; questi ultimi poi possono infettare la placenta ed eventualmente il feto (Innes E.A., 2000, 2002, 2005; Quinn H.E. et al., 2002). La trasmissione transuterina di *N. caninum* dalla madre al feto è molto efficiente e la neosporosi fetale acuta è una delle principali cause di aborto e natimortalità nel bovino (se la trasmissione avviene a metà della gestazione); nell'ultima parte della gestazione è possibile la nascita di vitelli con forme cliniche oppure perfettamente sani ma portatori del parassita. La trasmissione nelle prime fasi della gravidanza porta invece alla morte e al riassorbimento fetali, rilevabili nell'allevamento bovino come problemi di infertilità e ritorni in calore (Gondim L.F.P. et al. 2005). La trasmissione verticale nella bovina può avvenire (a differenza di quanto accade in *T. gondii*) anche nel corso delle gravidanze successive e nel caso in cui manze portatrici sane di *N. caninum* vengano avviate alla carriera riproduttiva il parassita può diffondersi rapidamente in un allevamento (Björkman C. et al., 1996). Recentemente, la trasmissione verticale è stata suddivisa in trasmissione transplacentare esogena (se avviene in seguito a infezione primaria della madre) ed in trasmissione transplacentare esogena (se avviene in seguito a riattivazione di un'infezione latente) (Dubey J.P. et al., 2006).

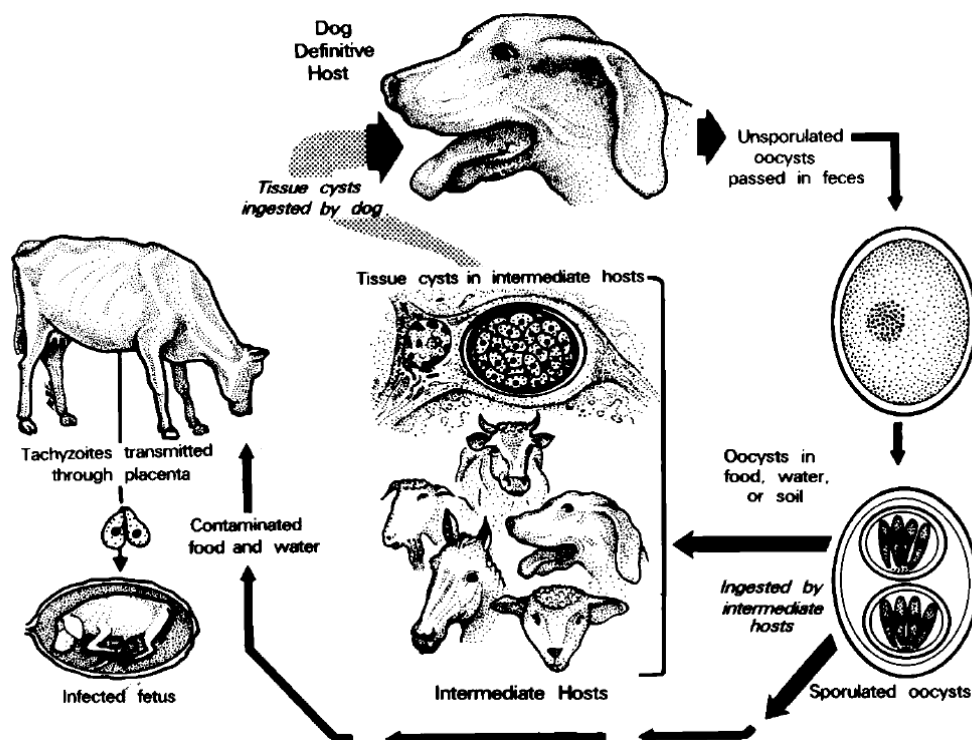


Figura 3. Ciclo biologico di *Neospora caninum*. Da Dubey J.P., 2003.

3.3 – Patogenesi.

La neosporosi bovina è una malattia che interessa prevalentemente la placenta e il feto e che ha luogo durante la gestazione in seguito ad uno status di parassitemia materna; come sopra ricordato, quest'ultima può derivare da un'infezione primaria (esogena) e dalla recrudescenza di un'infezione persistente (endogena) (Dubey J.P. et al., 2006). Dal momento che è stato ampiamente dimostrato che la trasmissione transplacentare del parassita è molto efficiente e che la maggior parte dei vitelli che subiscono l'infezione intrauterina nascono sani è sorto il dubbio che anziché un patogeno primario *Neospora* possa essere un patogeno opportunistico (Thurmond M.C. et al., 1997; 1999). Tale ipotesi è però stata esclusa e *N. caninum* è oggi riconosciuto come patogeno primario in grado di provocare aborto poiché provoca infiammazione della placenta, necrosi della placenta e del feto e danno ai tessuti fetali; tali conseguenze possono essere presenti singolarmente o in associazione tra loro (Dubey J.P. et al., 2006). Le lesioni più gravi infatti sono state descritte a livello di placenta (moltiplicazione del parassita nei villi

fetali, con conseguente necrosi dei villi stessi e presenza di trasudato tra i villi fetali e il setto materno, nonché presenza di infiltrati infiammatori ricchi di cellule CD4+, CD8+ e di linfociti T $\gamma\delta$ e di feto (degenerazione diffusa del neuropilo, con o senza presenza di infiammazione, nonché distruzione di numerosi tessuti fetali – cuore, muscolo scheletrico, polmoni e fegato – associata a infiltrati infiammatori linfocitari) (Macaldowie C. et al., 2004; Innes E.A. et al., 2005; Buxton D. et al., 2002; Wouda W. et al., 1997).

Ad oggi non sono ancora noti i meccanismi patogenetici dell'aborto; solitamente tale evento si verifica quando la placenta è talmente danneggiata da non essere di per sé un tessuto vitale ed in grado di svolgere la sua funzione fisiologica, e sono diversi i fattori che potrebbero portare ad una situazione simile (Dubey J.P. et al., 2006). Un danno placentare direttamente legato alla replicazione del parassita potrebbe sia danneggiare direttamente il feto che provocare il rilascio di prostaglandine materne che a loro volta causerebbero la luteolisi e l'aborto (Baetz A.L. et al., 1981; Foley G.L. et al., 1993; Engeland I.V. et al., 1996). I danni al feto potrebbero essere dovuti alla patologia tissutale primaria causata dalla moltiplicazione di *N. caninum* nel feto oppure a livelli nutrizionali e di ossigenazione insufficienti a causa del danno alla placenta. Inoltre, l'espulsione immunomediata del feto da parte della madre potrebbe essere associata al rilascio di citochine proinfiammatorie a livello placentare (vedi paragrafo successivo) (Dubey J.P. et al., 2006). Non è noto fino a che punto i meccanismi immunitari che portano all'espulsione fetale e la luteolisi indotta dall'azione delle prostaglandine si sovrappongano o interagiscano; inoltre non è nemmeno chiaro se i primi siano in grado di influenzare il decorso di infezioni avvenute nelle prime fasi della gravidanza e la seconda svolga un ruolo più importante nelle ultime fasi della gestazione. Anche un'ossigenazione insufficiente è in grado, a fine gestazione, di indurre nel feto la produzione di ACTH, che causa a sua volta una stimolazione delle surrenali del feto; il cortisolo fetale è in grado di indurre la placenta a produrre estrogeni e prostaglandina F2 α ad azione luteolitica, anti-progestinica. Quest'ultimo meccanismo endocrino potrebbe essere coinvolto negli episodi di aborto tardivo – nascite premature di vitelli infetti da *N. caninum* (Dubey J.P. et al., 2006). Tutti questi meccanismi ipotetici sono sicuramente correlati tra di loro in qualche modo e a seconda delle occasioni uno o più

di essi potrebbe svolgere un ruolo principale; comunque tutti probabilmente sono influenzati dal momento della gestazione (Dubey J.P. et al., 2006).

Tenendo presente che l'immunocompetenza del feto si sviluppa progressivamente nel corso della gravidanza, in tutte le infezioni sperimentali condotte nel bovino si è visto che il discrimine temporale che consente ai feti di resistere all'infezione o di nascere infetti ma sani è il giorno 95 della gestazione (Dubey J.P. et al., 2006).

3.4 – La risposta immunitaria nella neosporosi.

A fronte degli approfonditi studi condotti sulla risposta immunitaria dell'ospite in corso di toxoplasmosi (riportati in diverse review, tra cui quelle di Darcy F. et al., 1994; Candolfi E et al., 1996; Gazzinelli R.T. et al., 1996a; Hunter C.A. et al., 1996; Nagasawa H. et al., 1996; Alexander J. et al., 1997; Innes E.A., 1997), la risposta immunitaria nei confronti di *Neospora* non è ancora stata ben caratterizzata e descritta (Hemphill A., 1999). Ci sono ancora notevoli carenze per quello che riguarda il ruolo delle risposte immunitarie umorale e cellulo-mediata, nonché sul ruolo delle citochine coinvolte nella risposta all'infezione da *N. caninum*. In base ai dati ad oggi disponibili, sembra che alcune delle risposte immunitarie nei confronti di *N. caninum* proteggono l'ospite, altre proteggono il parassita e altre ancora risultano essere patogene. Tra i numerosi aspetti degli aspetti immunitari dell'interazione ospita-parassita ancora poco chiari ne spiccano alcuni: il ruolo dell'induzione precoce dell'immunità innata e il ruolo di quest'ultima nel priming dell'immunità acquisita; i meccanismi immunitari antiparassitari protettivi; le alterazioni del sistema immunitario in gravidanza e come ciò influenza lo sviluppo del parassita all'interno dell'ospite; gli stimoli in grado di indurre la trasformazione dell'infezione acuta in infezione persistente; i siti dell'infezione persistente nell'ospite; gli stimoli per la recrudescenza dell'infezione in grado di portare alla parassitemia e alla relativa trasmissione al feto; il ruolo della risposta immunitaria nel causare la malattia (Innes E.A., 2007).

La maggior parte delle conoscenze sulla risposta immunitaria a *N. caninum* sono state ottenute in vitro (con l'impiego di linee cellulari o di colture primarie) o in vivo, in quest'ultimo caso prevalentemente nel topo e nel bovino.

Il modello murino.

Solo recentemente è stata riportata l'infezione naturale nei roditori (Jenkins M.C. et al., 2007; Ferroglio E. et al., 2007) e in un primo momento l'impiego del modello murino è stato ostacolato da alcune difficoltà (Dubey J.P. et al., 1993). In ogni caso, nei primi esperimenti di infezione nel topo in seguito all'infezione sono comparse forme di polmonite acuta, miosite, encefalite, ganglioradicoloneurite e pancreatite (Lindsay D.S. et al., 1990); è stato anche osservato che certi strain murini sono più sensibili di altri per quello che riguarda l'infezione al SNC (Lindsay D.S. et al., 1995; Long M.T. et al., 1998). Per ottenere l'infezione è necessario solitamente l'impiego di un maggior numero di tachizoiti rispetto a certi strain virulenti di *T. gondii* (ad esempio, l'RH), letali a dosaggi d'inoculo molto bassi (Howe D.K. et al., 1995). Alcuni autori (Khan L.A. et al., 1997) hanno studiato la risposta cellulare all'infezione da *N. caninum* in topi inbred A/J. Tali animali non hanno manifestato né segni clinici di neosporosi né alterazioni importanti dal punto di vista istologico. Gli splenociti ottenuti dai topi infetti sono proliferati in vitro in risposta agli antigeni solubili sia di *N. caninum* che di *T. gondii*, suggerendo in tal modo la presenza di determinanti immunogenici cross-reattivi. La diversità biologica e comunque anche immunologica dei due parassiti è stata però dimostrata da Lindsay D.S. et al. (1990b), che hanno osservato come, sempre nel topo, una precedente infezione con *N. caninum*, non abbia offerto alcuna protezione nei confronti del challenge con tachizoiti dello strain RH di *T. gondii*. Al settimo giorno dopo l'infezione dei topi con *N. caninum* è stata osservata una iporesponsività linfocitaria transitoria (2-3 giorni) (Khan L.A. et al., 1997). Un fenomeno simile ma di maggior durata è stato dimostrato durante la fase acuta dell'infezione di alcuni topi con strain sia virulenti che avirulenti di *T. gondii* (Howe D.K. et al., 1995). Nelle infezioni da *N. caninum*, questo effetto immunosoppressivo si è ripresentato al giorno 10 ed è persistito fino al giorno 14, corrispondente alla fine dello studio. L'iporesponsività agli antigeni e ai mitogeni di origine parassitaria era dovuta principalmente all'induzione dell'ossido nitrico, che è già stato identificato come un'importante molecola ad azione regolatoria nelle infezioni da *Plasmodium* (Rockett K.A. et al., 1994) e da *T. gondii* (Gazzinelli R.T. et al., 1994; Khan L.A. et al., 1995). Il trattamento degli splenociti con inibitori della sintesi dell'ossido nitrico in parte ha infatti in parte ripristinato la responsività degli splenociti all'antigene di *N. caninum* (Khan L.A. et al., 1997).

Nella forma acuta della toxoplasmosi murina la citochina IL-10 è stata individuata come responsabile della downregulation delle risposte di proliferazione linfocitaria (Khan L.A. et al., 1995). Nelle infezioni da *N. caninum*, sembra che ciò non accada (Khan L.A. et al., 1997). Nel modello murino il meccanismo protettivo principale nei confronti di *N. caninum* sembra coinvolgere l'IL-12 e l'IFN γ e topi trattati con anticorpi nei confronti di queste citochine sono risultati più suscettibili all'infezione. È stato anche dimostrato che queste due citochine sono essenziali per la protezione nei confronti di numerosi agenti infettanti, compreso *T. gondii* (Hunter C.A. et al., 1995). Osservazioni precedenti raccolte in esperimenti in vitro avevano già suggerito come l'IFN γ svolga un ruolo di vitale importanza nell'accrescimento dei tachizoiti di *N. caninum*: il trattamento di fibroblasti di pecora con IFN γ ovino ricombinante durante le 24 ore precedenti l'infezione con Neospora è stato in grado di inibire in maniera significativa la replicazione del parassita (Innes E.A. et al., 1995). In conclusione, i meccanismi della protezione dell'ospite nei confronti di *N. caninum* sembrano essere simili per molti versi – ma non per tutti – a quelli della risposta immunitaria nei confronti di *T. gondii* (Hemphill A., 1999). In uno studio approfondito condotto infettando con *N. caninum* diversi strain murini (BALB/C, C57BL/6, B.10.D2) sono state descritte la carica parassitaria intracerebrale, lo sviluppo delle lesioni e le citochine osservate a livello sistemico (Long et al., 1998) sei settimane dopo l'infezione. I topi BALB/C e C57BL/6 sono risultati essere altamente suscettibili (in base alle lesioni dell'SNC e in base alla carica parassitaria) allo sviluppo dell'encefalite indotta da *N. caninum*, mentre i topi B10.2 si sono dimostrati resistenti. La resistenza in questi ultimi era associata ad un'elevato rapporto IFN γ :IL-4 negli splenociti stimolati con l'antigene.

Più recentemente, Kasper L.H. e Khan I.A. (1998) hanno dimostrato che la vaccinazione dei topi con tachizoiti interi di *N. caninum* è stata in grado di proteggere tali topi nei confronti di un challenge letale con *T. gondii*, e tale protezione è stata mediata dalla presenza di cellule CD8+ cross-reattive rinvenute dalla milza dei topi vaccinati. Tali osservazioni sono molto differenti rispetto a quelle riscontrate nei primi studi effettuati da Lindsay D.S. e coll. (1990b). In ogni caso, sembra che il grado di protezione sia ampiamente dipendente dallo strain impiegato per il challenge. Ciò è stato recentemente confermato in uno studio, condotto da Lindsay D.S. e coll. (1998), nel quale l'efficacia della vaccinazione con *N. caninum* è stata valutata con un challenge

orale di oocisti di *T. gondii*. In tale ricerca è stato dimostrato che la vaccinazione con *N. caninum* fornisce un certo grado di protezione nei confronti dell'infezione letale condotta con oocisti di uno strain di *T. gondii* a patogenicità moderata, ma non nei confronti di un'infezione letale condotta con tachizoiti di uno strain ad elevata patogenicità.

È stato anche messo a punto un modello murino dell'infezione con *N. caninum* impiegando topi knock-out per la catena μ delle IgM in confronto a topi wild type dello stesso strain (C57BL/6) (Éperon S. et al., 1999). Entrambe i tipi di topi sono stati infettati con tachizoiti o vaccinati con parassiti morti di *N. caninum*, e poi sono stati sacrificati a diversi intervalli di tempo. I topi knock-out sono stati colpiti in più organi e più pesantemente dall'infezione (dimostrazione mediante istologia, PCR, immunoistochimica), compresa la presenza esclusiva di foci necrotici a livello cerebrale fortemente positivi per *N. caninum* all'IHC. Gli splenociti di entrambe i tipi di topi infetti hanno prodotto elevati livelli di IFN γ e di IL-10, rispetto a quelli dei topi semplicemente immunizzati. A differenza dei topi wild type però, gli splenociti topi knock-out hanno prodotto quantità minori di IL-10, in maniera sempre più evidente col progredire dell'infezione. Pertanto, sembra che la maggior suscettibilità dei topi knock-out per la catena μ delle IgM sia stata causata almeno in parte dalla minor produzione di IL-10 da parte della milza (Éperon S. et al., 1999).

La modulazione della risposta mista di citochine Th1/Th2 in topi Balb/c verso il braccio Th2 mediante somministrazione dell'IL-12 è risultata in una protezione transitoria nei confronti dell'infezione da *N. caninum* (Baszler T.V. et al., 1999). D'altro canto, in un'altra ricerca è stato dimostrato che in topi immunizzati con vaccinia virus ricombinanti basati su NcSRS2 gli anticorpi di tipo IgG1 sono importanti per la clearance del parassita nelle prime fasi dell'infezione (Nishikawa Y. et al, 2001). I livelli di una sottoclasse anticorpale rispecchiano la produzione in vivo di determinati tipi di citochine, e visto che le citochine Th1 (IL-12, IFN γ) favoriscono la produzione di anticorpi IgG2a e quelle Th2 (IL-4, IL-10) favoriscono invece quelli IgG1, sembra che in questi topi sia risultata efficace una risposta del secondo tipo (Th2).

Il ruolo dell'immunità nel controllo o nella permissività della recrudescenza del parassita durante la gravidanza è indispensabile perché avvenga l'infezione fetale (Hemphill A. et al., 2006). Nel topo, lo shift verso le citochine Th2 osservato in animali

gravidì (Athanasakis I. et al., 1996) potrebbe favorire la riattivazione di *N. caninum*. Alcuni studi effettuati a partire da questa considerazione hanno dimostrato come la neutralizzazione dell'IL-4 prima della gravidanza – ed in concomitanza con l'inoculo di *N. caninum* – sia stata in grado di ridurre la trasmissione verticale in seguito a un challenge effettuato durante la gestazione (Long M.T. et al., 2000). In un altro studio sono stati messe a confronto le risposte immunitarie successive all'infezione con *N. caninum* in topi gravidì e non gravidì (Quinn H.E. et al., 2004). Le cellule spleniche dei topi infetti/non gravidì e dei topi infetti/gravidì hanno prodotto IFN γ , IL-12 e TNF α ; comunque, nei topi infetti/gravidì i livelli di citochine Th1 rilevati erano inferiori. I topi infetti/non gravidì e quelli infetti/gravidì hanno anche prodotto la citochina Th2 IL-10, senza che però che i livelli di questa citochina calassero nei topi gravidì. Il calo della produzione di citochine Th1 nei topi infetti/gravidì è stato posto in correlazione con la presenza di elevati livelli di IL-4 rilevata esclusivamente in questi animali (Quinn H.E. et al., 2004). I topi infetti durante la gravidanza sono risultati meno protetti dal punto di vista immunitario rispetto a quelli infetti in momenti diversi dalla gravidanza, e i topi infetti durante la gravidanza inoltre presentano una forte risposta Th2 anche durante la recrudescenza dell'infezione (Kano R. et al., 2005). È stato dimostrato, analogamente a quanto accade nel bovino, che il tasso di trasmissione del parassita al feto nel corso di gravidanze successive diminuisce (Rettigner C. et al., 2004).

Il modello bovino.

Risposta immunitaria materna. Sono ancora molto scarse le conoscenze riguardanti l'induzione precoce della risposta immunitaria e di quella acquisita in seguito all'invasione e alla moltiplicazione intracellulare del parassita (Hemphill A. et al., 2006). Dati recenti hanno dimostrato che nell'immunità innata del bovino nei confronti di *N. caninum* sono coinvolte le cellule Natural Killer (NK), in grado di causare la lisi di fibroblasti infetti da *N. caninum* e di produrre IFN γ in seguito a stimolazione diretta con tachizoiti di *N. caninum* (Boysen P. et al., 2006). Tale induzione precoce della produzione dell'IFN γ potrebbe essere importante per il controllo della moltiplicazione intracellulare del parassita e, inoltre, potrebbe creare un ambiente citochinico appropriato per l'induzione dello sviluppo di una risposta immunitaria di tipo Th1, così come è già stato dimostrato per *T. gondii* (Innes E.A., 2007). Dal momento che *N.*

caninum è un parassita intracellulare obbligato, le cellule T in grado di riconoscere le modificazioni cellulari presenti nelle cellule infette probabilmente sono importanti in una risposta immunitaria protettiva (Innes E.A. et al., 2000, 2002). In bovini infetti sperimentalmente con *N. caninum* è stata dimostrata una proliferazione cellulare antigene-specifica e la produzione di IFN γ (Marks J. et al., 1998; Lunden A. et al., 1998; DeMarez T. et al., 1999; Williams D.J. et al., 2000; Andrianarivo A.G. et al., 2001; Trees A.J. et al., 2002) e in studi in vitro è stato dimostrato che le citochine IFN γ e TNF α sono in grado di inibire la moltiplicazione del parassita in fibroblasti e cellule di encefalo bovino (Innes E.A. et al., 1995; Yamane I. et al., 2000). Inoltre, è stato anche dimostrato che linfociti T CD4+ sono risultati essere citotossici per cellule infette da *N. caninum* (Staska L.M. et al., 2003, 2005). Questa è un'altra differenza importante con *T. gondii*, ove questo ruolo citotossico è svolto prevalentemente da cellule CD8+ (Hakim F.T. et al., 1991). Anche la risposta anticorpale sembra essere importante nella protezione dall'infezione da *N. caninum* probabilmente essendo in grado di limitare l'invasione delle cellule da parte del parassita (Innes E.A. et al., 2002; Haldorson G.J. et al., 2006).

È noto che i livelli anticorpali specifici per *Neospora* subiscono delle fluttuazioni nel corso della gravidanza (Pare J. et al., 1997; Stenlund S. et al., 1999; Guy C.S. et al., 2001; Andrianarivo A.G. et al., 2005) e ciò probabilmente indica un certo grado di attività del parassita all'interno dell'ospite. Un aumento dei livelli di anticorpi specifici dovrebbe indicare una maggior attività replicativa all'interno dell'ospite. In ricerche che si proponevano di impiegare questo fenomeno come indicatore della malattia è stato osservato che un aumento dei titoli anticorpali a metà gestazione è presente in animali che in seguito vanno incontro ad aborto, mentre un aumento dei titoli anticorpali a fine gravidanza è risultato associato alla trasmissione verticale del parassita senza abortire il feto (Pare J. et al., 1997; Stenlund S. et al., 1999; Guy C.S. et al., 2001). Non sono ancora ben chiari nella neosporosi bovina gli stimoli in grado di causare la riattivazione dei bradizoiti endogeni che a sua volta porta all'invasione per via circolatoria della placenta prima e del feto poi. Chiaramente, il momento dell'infezione è di fondamentale importanza. Tanto più precoce è la parassitemia, tanto più sarà grave il suo effetto sul feto (Innes E.A., 2007). La riattivazione e la conversione dei bradizoiti in tachizoiti in attiva moltiplicazione, prendendo a modello quanto avviene in individui

immunodepressi infetti da *T. gondii*, avviene quando le risposte immunitarie di tipo cellulo-mediato supportate dai linfociti T e dall'IFN γ si indeboliscono (Luft B.J. et al., 1984). Le risposte mediate dai linfociti T e dall'IFN γ sono importanti per l'inibizione della moltiplicazione di *N. caninum* e pertanto qualunque alterazione delle stesse nella madre a causa della gravidanza potrebbero stimolare la riattivazione del parassita all'interno dell'ospite (Innes E.A. et al., 2001). Per permettere alla madre di ospitare il feto (entità semi-antigenica) senza che avvengano fenomeni di rigetto, l'ambiente citochinico a livello dell'interfaccia materno-fetale è sbilanciato a favore di citochine ad azione perlopiù regolatoria, quali IL-10, IL-4 e TGF β (Entrican G., 2002). Queste citochine ad azione regolatoria sono in grado di contrastare l'azione delle citochine proinfiammatorie quali l'IFN γ , potenzialmente dannose per la gravidanza e causa di morte fetale (Tangri S. et al., 1993). L'infezione da *N. caninum* causa l'insorgenza di una risposta cellulo-mediata supportata da linfociti T e dall'IFN γ e finalizzata al controllo della moltiplicazione del parassita; tale risposta potrebbe contribuire alla patogenesi della malattia in animali gravidi a seconda della localizzazione tissutale in cui tale risposta infiammatoria viene evocata (Innes E.A. et al., 2007). Studi recenti condotti su placenti di bovine infettate con *N. caninum* a 10 settimane di gestazione hanno dimostrato la presenza di un maggior numero di linfociti T CD4+ e CD8+, di cellule NK nonché maggiori quantità di IFN γ all'interno dell'infiltrato infiammatorio associato alle lesioni placentari delle vacche in cui era avvenuta la morte fetale (Maley S. et al., 2006). Al contrario, in vacche infettate con *N. caninum* ma che non avevano abortito non è stato riscontrato alcun tipo di risposta infiammatoria a livello placentare (Maley S. et al., 2006). Nell'ambito della neosporosi bovina è ancora poco chiaro se la modulazione immunitaria naturale che avviene in corso di gravidanza comprometta la capacità della madre di allestire una risposta immunitaria cellulo-mediata basata sulle citochine proinfiammatorie e quindi impedisca il controllo della replicazione del parassita. È evidente il dilemma davanti al quale si trova l'organismo della vacca gravida, poiché da un lato l'immunoregolazione tipica della gravidanza potrebbe ridurre le capacità di controllare l'infezione da *N. caninum*, dall'altro una risposta di tipo protettivo nei confronti del parassita metterebbe a rischio il buon esito della gravidanza stessa (Innes E.A. et al., 2005). In ricerche condotte su un altro protozoo intracellulare (*Leishmania major*) e nel modello murino è stato dimostrato che in corso di gravidanza

si assiste alla deviazione della risposta immunitaria in senso regolatorio (coinvolgente cioè citochine IL-4 e IL-10) anziché proinfiammatorio (coinvolgente cioè l'IFN γ) e il risultato è il minor controllo dell'infezione da parte degli animali gravidi (Krishnan L. et al., 1996). Studi effettuati nel bovino hanno permesso di evidenziare come non ci sia nei cloni dei linfociti T una chiara divisione Th1/Th2, ed è stata osservata l'espressione sia di IFN γ che di IL-4 (Brown W.C. et al., 1998). In vacche infettate con *N. caninum* a 10 e a 30 settimane di gestazione sono state riscontrate nei linfociti del sangue periferico frazioni cellulari ricche di linfociti T CD4+ e tali cellule in seguito alla stimolazione in vitro antigene specifica hanno prodotto sia IL-4 che IFN γ in seguito alla stimolazione in vitro antigene specifica (Rosbottom A. et al., 2007).

Nell'insieme, questi dati indicano che una risposta immunitaria proinfiammatoria a livello di interfaccia materno-fetale potrebbe risultare dannosa al feto e potrebbe compromettere la gravidanza, mentre una risposta dello stesso tipo ma alla periferia dell'organismo o in altri linfonodi regionali potrebbe aiutare nel controllo dell'infezione (Innes E.A. et al., 2005).

Risposta immunitaria fetale. La capacità del feto bovino di allestire una risposta immunitaria nei confronti di un patogeno invasivo aumenta progressivamente durante la gestazione (Osburn B.I. et al., 1982). Una risposta di proliferazione cellulare ad un mitogeno generico può essere individuata da 12 settimane di gestazione in poi (Osburn B.I. et al., 1982), mentre a 14-15 settimane di gestazione questa risposta da parte di timociti e splenociti è già antigene-specifica (Innes E.A. et al., 2005). A 130 giorni di gestazione gli splenociti fetali delle vacche infettate con *N. caninum* erano in grado di trascrivere IFN γ , TNF α , IL10 ad un livello maggiore rispetto ai feti di madri non infette, dimostrando in tal modo una precoce comparsa di una risposta cellulo-mediata. Con il progredire della gestazione, a 168 giorni è stato dimostrato che cellule di origine linfonodale di feti di madri infette erano in grado di proliferare e produrre IFN γ in seguito a stimolazione con *N. caninum* (Innes E.A. et al., 2005). A partire da questi dati è chiaro che se l'infezione avviene nelle prime fasi della gravidanza il feto probabilmente non è in grado di difendersi dal patogeno ed il parassita si diffonderà rapidamente nei tessuti fetali (Dubey J.P. et al., 2006). In studi sulla risposta immunitaria fetale è stato osservato che intorno ai 4-7 mesi di gestazione nelle bovine infette da *N. caninum* erano presenti risposte di tipo cellulo-mediato ed anticorpali;

infatti, a 182 giorni di gestazione sono state identificate le IgG e le IgM specifiche nei confronti del parassita e nell'insieme, a 220-230 giorni sia la risposta umorale che quella cellulomediata erano ben sviluppate. (Andrianarivo A.G. et al., 2001; Almeria S. et al., 2003; Bartley P.M. et al., 2004). L'immunocompetenza del feto al momento del challenge infettante è in grado di influenzare la gravità della malattia e la replicazione del parassita (Innes E.A., 2007). In un recente studio è stata descritta la distribuzione dei parassiti all'interno di diversi tessuti fetali e sono state comparate la carica parassitaria e le lesioni nei feti abortiti a diversi stadi della gestazione (Collantes-Fernandez E. et al., 2006). Le cariche parassitarie più elevate sono state rinvenute nel primo trimestre di gravidanza; nelle fasi successive si è assistito ad una diminuzione di tale carica. I parassiti erano presenti in diversi tessuti (cervello, cuore, rene, polmone) all'inizio della gestazione, mentre nel terzo trimestre sono stati individuati quasi esclusivamente a livello cerebrale. Anche la gravità delle lesioni è risultata essere maggiore nei primi due trimestri di gravidanza, rispetto all'ultimo, a indicare che la gravità della malattia è influenzata dall'età del feto (Collantes-Fernandez E. et al., 2006).

Un altro interessante aspetto dell'infezione intrauterina da parte di *N. caninum* è rappresentato dalle conseguenze immunologiche dell'infezione congenita e come esse si pongano in relazione con l'età della gestazione al momento dell'infezione. I feti che subiscono infezione prima dei 120 giorni di gestazione con il biotipo non-citopatogeno di BVDV (bovine viral diarrhoea virus) possono nascere persistentemente infetti ma apparentemente immunotolleranti, visto che non presentano anticorpi specifici contro il virus (Brownlie J. et al., 1993). Non si sa se in qualche raro caso questo possa accadere anche in vitelli con infezione congenita da *N. caninum*. Ricerche condotte mediante infezione sperimentale di vacche gravide hanno evidenziato che occasionalmente i vitelli nati da madri infette risultavano essere sieronegativi a *N. caninum* in campioni pre-colostrali ma albergavano parassiti a livello cerebrale evidenziati post mortem (Innes E.A. et al., 2001; 2007). Inoltre, è stato descritto un altro caso di un vitello nato da una vacca sieropositiva a *N. caninum* che aveva bassi titoli anticorpali precolostrali ma che è risultato positivo alla ricerca di cisti a livello cerebrale (Kyaw T. et al., 2005).

Esistono anche altri modelli animali per lo studio della risposta immunitaria nei confronti di *N. caninum*. L'infezione sperimentale delle pecore ha permesso di

dimostrare che tali animali sono molto suscettibili all'azione di *N. caninum* (McAllister M.M. et al., 1996, Buxton D. et al., 1997). È stato riportato, mediante infezioni sperimentali in questa specie, che l'inoculo di *N. caninum* durante la gravidanza ha provocato la morte di tutti i feti, mentre l'inoculo del parassita prima della gravidanza non solo non ha causato mortalità ma è stato in grado di fornire un certo grado di protezione nei confronti di un successivo challenge con *N. caninum* durante la gravidanza (Hemphill A. et al, 1999). Un'altra conferma della diversità del tipo di risposta immunitaria a *N. caninum* e *T. gondii* è stata data dal fatto che la vaccinazione delle pecore con il vaccino attenuato Toxovax (Intervet) non è stato in grado di proteggere le pecore da un challenge con *N. caninum* effettuato durante la gravidanza (Hemphill A. et al, 1999).

3.5 – Le cellule dendritiche e *Toxoplasma gondii*.

In assenza di dati disponibili sull'interazione tra cellule dendritiche e *Neospora caninum*, si riporta una sintesi di quanto è noto per il parassita più strettamente simile a *N. caninum* stesso, cioè *Toxoplasma gondii*.

Nell'ultimo decennio sono state individuate numerose funzioni delle cellule dendritiche (DC), al di là della presentazione antigenica, che era l'unica funzione ben nota. Le DC infatti possono influenzare anche la qualità della risposta immunitaria, possono contribuire alla tolleranza immunitaria, alla downregulation delle risposte effettrici e al mantenimento della memoria (Scott P. et al., 2002).

Mentre è abbastanza noto quanto accade dopo l'incontro tra la DC ed un patogeno batterico o virale (attivazione e maturazione delle DC mediante legame ai TLR, contemporaneamente alla produzione di IL-12 e altre citochine, aumento dell'espressione delle molecole costimolatorie, migrazione dalla periferia dell'organismo agli organi linfoidi, vedi Capitolo 2 sull'immunità innata), sono meno noti gli eventi che seguono l'infezione di queste cellule da parte dei parassiti. La stimolazione di DC spleniche (sottotipo CD8 α +) con antigene solubile di *T. gondii* (STAg) è stata in grado di indurle a produrre IL-12, nonché di indurle a migrare dalle aree marginali (polpa rossa) ai manicotti perivascolari (area delle cellule T) della milza (Reis e Sousa C, et al., 1997). Studi più recenti hanno permesso di dimostrare che

cellule dendritiche derivanti dal midollo osseo e prive del sottotipo CD8 α + non rispondono altrettanto bene in termini di produzione di IL-12 (Aliberti J. et al., 2004); questo potrebbe rappresentare una difficoltà per l'allestimento di un modello in vitro dell'infezione delle DC in specie diverse dall'uomo e dal topo, dove sono scarsi i metodi di separazione e purificazione di specifici sottotipi di DC. La produzione di IL-12 delle DC spleniche a STAg in vivo è risultata estremamente rapida (3-6 ore) ed associata ad un aumento dell'espressione di superficie di CD40 (Schulz O. et al., 2000). Successivamente è stato osservato un altrettanto rapido calo nella produzione dell'IL-12 (tornata a livelli basali entro 24 ore), associato ad una iporesponsività ad una seconda somministrazione di STAg. Tale fenomeno, definito "paralisi delle DC" è durato 1 settimana e non era associato né all'apoptosi delle DC né a una soppressione mediata dall'IL-10 (Reis e Sousa C. et al., 1999). La produzione di IL-12 in risposta allo STAg da parte delle DC spleniche è molto più elevata rispetto a quella che si osserva stimolando le stesse cellule con altre sostanze (LPS, oligonucleotidi CpG...) ad azione proinfiammatoria. Ciò fa supporre l'utilizzo di un nuovo pathway di attivazione o di un'azione sinergica mediata dall'interazione tra gli antigeni del parassita e più ligandi delle DC (Aliberti J. et al., 2004). Per individuare i recettori responsabili della produzione di IL-12 da parte delle DC sono innanzitutto stati presi in considerazione i recettori della superfamiglia TLR/IL1-R, tradizionalmente responsabili del riconoscimento di PAMP. Per fare ciò si sono impiegati topi knockout per MyD88 (myeloid differentiation factor 88), una molecola adapter impiegata da tutti i TLR, dall'IL-1R e dall'IL18R per la trasduzione dei loro rispettivi segnali. Le DC provenienti da questi animali non presentavano la tipica produzione di IL-12 in seguito alla stimolazione con STAg e gli animali stessi sono risultati molto più suscettibili all'infezione (Scanga C. et al., 2002); impiegando topi knockout per IL-18R e inibitori dell'IL-1R è stato possibile comprendere che tale soppressione è mediata pertanto dai TLR (Aliberti J. et al., 2004). Nonostante ciò non è stato ancora possibile individuare il o i TLR coinvolti, a parte un probabile ruolo svolto dal TLR2, che si è dimostrato fondamentale nella resistenza del topo a elevate dosi challenge di *T. gondii* (Mun H.S. et al., 2003) nonché per la secrezione di chemochine da parte di neutrofili stimolati con STAg (Del Rio L. et al., 2004). Tale ruolo del TLR2 non è però stato confermato in vitro, poiché le DC e i neutrofili provenienti da topi knockout (TLR2-) la produzione di

IL-12 in reazione allo STAg era normale. Pertanto è probabile che la produzione di IL-12 dipenda da un TLR non ancora identificato o da un pattern di riconoscimento antigenico mediato da MyD88 diverso dai TLR (Aliberti J. et al., 2004). È stato ipotizzato il coinvolgimento di un secondo tipo di recettore responsabile sia della produzione di IL-12 che della migrazione delle DC verso le aree T della milza in seguito alla stimolazione con STAg: il recettore per le chemochine CCR5 (Aliberti J. et al., 2000). In topi CCR5- (knockout) infatti, anche in seguito all'infezione con *T. gondii* è stata osservata una minor produzione di IL-12 e una minor resistenza all'infezione. Effetti simili sono stati descritti anche in topi trattati con la tossina della pertosse (PTX), che è una molecola disaccoppiante il pathway di segnalazione della proteina G impiegato dai recettori delle citochine (Aliberti J. et al., 2000). Da questi risultati è possibile dedurre che la produzione di IL-12 da parte delle DC dipende sia dal pathway dipendente da MyD88 che da quello accoppiato alla proteina G (Scanga C. et al., 2002). La ricerca di un preciso ligando in grado di indurre le DC a produrre IL-12, rispetto al semplice STAg ha permesso di individuare una isoforma della ciclofillina (C-18) di *T. gondii*. C-18, ligando di CCR5 piuttosto che di un TLR, è stata in grado di indurre la produzione di IL-12 da parte delle DC ma a livelli inferiori rispetto allo STAg, pertanto è presumibile che esistano altri ligandi aggiuntivi che dovranno essere individuati mediante esperimenti di frazionamento (Aliberti J. et al., 2003).

Mentre da un lato è stato rilevato come la produzione di IL-12 e IFN γ sia indispensabile per la resistenza nei confronti di *T. gondii*, dall'altro è chiaro che una produzione eccessiva di queste citochine può portare a patologie tissutali e alla morte dell'animale. Un primo riscontro di quest'ipotesi è venuto dall'osservazione dell'andamento dell'infezione da *T. gondii* in topi knockout per IL-10: il controllo dell'infezione in questi animali, in assenza di stimoli regolatori tipici di IL-10, coincideva con una rapida morte associata ad un eccesso di produzione di IL-12, TNF, IFN γ e a danni epatici (Gazzinelli R.T. et al., 1996); è importante sottolineare che però DC provenienti da animali knockout per IL-10 sono state in grado di produrre normali quantità di IL-12 in risposta allo STAg (Reis e Sousa C. et al., 1999). Un fenomeno che potrebbe spiegare il calo dell'intensità della produzione di IL-12 in corso d'infezione è la paralisi delle DC osservata subito dopo una prima stimolazione delle stesse con STAg; tale paralisi è stata infatti associata a una downregulation di CCR5. Ricercando le possibili cause di questa

downregulation è stata individuata la lipossina A4 (LXA4, un metabolita dell'acido arachidonico generato mediante il pathway dipendente dalla 5-lipossigenasi), che inibisce la produzione di IL-12 da parte delle DC (Aliberti J. et al., 2002) e che è un ligando per un recettore formyl peptide-like 1 (Chiang N. et al., 2000), in grado a sua volta di causare la downregulation di CCR5. STAg si è dimostrato un potente stimolo alla produzione di LXA4 in vivo; topi knockout per il pathway della sintesi della LXA4 hanno manifestato elevata produzione di IL-12 e a differenza degli animali wildtype sono deceduti 28 giorni dopo probabilmente per l'incapacità di controllare l'infezione (Aliberti J. et al., 2002b). Sembra che i tachioziti di *T. gondii* siano in grado, almeno in parte, di sintetizzare LXA4 a partire dall'acido arachidonico, grazie a un'attività intrinseca di una 15-lipossigenasi parassitaria (Bannenberg G.L. et al., 2004). IL-10 e LXA4 svolgono funzioni di immunomodulazione parzialmente sovrapposte, ma mentre la prima inattiva sia la produzione di citochine proinfiammatorie sia i meccanismi microbicidi, LXA4 inibisce la sola produzione di citochine proinfiammatorie senza influenzare l'eliminazione di parassiti intracellulari o la produzione di ossido nitrico (Aliberti J. et al., 2002b). Il fondamentale ruolo di IL-10 si può spiegare perché questa citochina, oltre ai suoi effetti generici di downregulation delle citochine è in grado principalmente di interferire con il signaling dell'IL-12 e dell'IFN γ , mediante l'induzione di molecole della famiglia SOCS (suppressor of cytokine signaling) (Krebs D.L. et al., 2001). Un altro importante ruolo delle DC nella risposta immunitaria a *T. gondii* è quello di indirizzare la risposta verso il braccio Th1, anche in assenza di IL-12. Nel modello classico di risposta innata, le DC producono infatti IL-12 che a sua volta induce nelle cellule NK la produzione di IFN γ . L'IL-12 stessa è anche ritenuta il "ponte" vero e proprio tra l'immunità innata e quella acquisita, poiché è in grado di promuovere lo sviluppo dei linfociti Th1 (Trinchieri G., 2003; O'Garra A. et al., 1995; Macatonia S.E. et al., 1995). In topi knockout per IL-12 infettati con *T. gondii* sono comparsi comunque linfociti T CD4+ antigene specifici in grado di orientare la risposta verso il tipo Th1 (Jankovic D. et al., 2002). Questo evento apparentemente paradossale si spiega perché probabilmente l'incontro tra il parassita o i suoi antigeni e le DC porta ad una upregulation dell'MHCII e delle molecole costimolatorie (come il CD40), ed entrambe questi eventi portano ad una interazione tra la APC e il linfocita T in grado di per sé di polarizzare la risposta in senso Th1 (Constant S.L. et al., 1997). Una

dimostrazione che questo meccanismo può agire indipendentemente dall'IL-12 è stata data in topi knockout per IL-12 nei quali, in seguito alla stimolazione con STAg le DC hanno manifestato normale migrazione all'interno della milza, normale produzione di citochine e upregulation di CD40 (Aliberti J. et al., 2004). In sintesi, questi dati sulle DC permettono di confermare che il pathway dipendente da MyD88 è fondamentale per una risposta efficace; inoltre, la parziale indipendenza da IL-12 della risposta delle DC non sminuisce il ruolo di questa citochina: l'IL-12 probabilmente promuove la risposta Th1 nelle fasi iniziali dell'infezione e nelle fasi successive, quando è ormai definito il ruolo delle cellule Th1 nel mantenimento di elevati livelli di IFN γ . Infine, è stato dimostrato che l'IL-12 svolge un ruolo fondamentale nella produzione di IFN γ da parte di cellule Th1 effettrici (Yap G. et al., 2000).

In base ai dati sperimentali descritti nella presente tesi, che sono i primi riguardo l'interazione tra DC e *Neospora caninum*, sembra che tale parassita sia in grado di infettare questo tipo cellulare e almeno in parte di essere processato ed espresso in associazione a molecole MHCII. Tali esperimenti saranno presentati in dettaglio nell'ultimo capitolo.

4 – CICLO BIOLOGICO, PATOGENICITÀ E RISPOSTA IMMUNITARIA A *LEISHMANIA INFANTUM*

La leishmaniosi canina è una malattia causata da *L.infantum* (in America Latina sinonimo di *L. chagasi*) ed è trasmessa dalla puntura dei flebotomi. I cani infetti rappresentano il principale reservoir domestico del parassita e rivestono un ruolo chiave nella trasmissione del parassita all'uomo, nel quale il parassita causa la leishmaniosi viscerale. Una maggior consapevolezza del fatto che il controllo dell'infezione nell'uomo dipende da un efficace controllo della leishmaniosi nel cane ha stimolato negli ultimi anni ricerche in quest'ultimo (Alvar J. et al., 2004).

Le leishmaniosi sono un gruppo di malattie parassitarie che nel loro complesso affliggono 14 milioni di persone in 88 paesi, causate da circa 24 specie di protozoi appartenenti al genere *Leishmania*. A seconda della specie di *Leishmania* coinvolta del tipo di risposta immunitaria dell'ospite esistono due forme cliniche principali: la forma cutanea che a sua volta a seconda della specie può essere cutanea diffusa (*L. amazonensis*), cutanea recidivante (*L. tropica*) o mucocutanea (*L. braziliensis*), e la forma viscerale. Quest'ultima, se causata da *L. donovani*, può evolversi eventualmente come leishmaniosi post-kala-azar. Si stima che ogni anno ci siano 1,5 milioni di nuovi casi di leishmaniosi cutanea e 0,5 milioni di nuovi casi di leishmaniosi viscerale. Ciascuna specie di *Leishmania* è altamente specifica riguardo alle forme cliniche, al reservoir ed alla specie di flebotomo coinvolta nella trasmissione. Da un punto di vista epidemiologico, la leishmaniosi viscerale viene definita antroponosi se causata da *L. donovani* e zoonosi se causata da *L. infantum*, ed in questo caso il cane è il principale reservoir d'infezione. La leishmaniosi canina è presente in circa 50 paesi degli 88 in cui sono presenti le leishmaniosi umane, prevalentemente in tre foci: la Cina, il bacino del Mediterraneo ed il Brasile (Alvar J. et al., 2004).

4.1 – Il parassita.

Leishmania infantum è un protozoo appartenente all'Ordine Kinetoplastorida, alla Classe Zoomastigophorasida e alla Famiglia Trypanosomatidae. La caratteristica

morfologica che accomuna i protozoi di questo Ordine è la presenza di una struttura mitocondriale contenente DNA extranucleare, detta kinetoplasto, strettamente associata ad un corpo basale da cui origina un unico flagello. Sulla base della disposizione e dell'aspetto di questi due organelli sono stati identificati i due stadi del parassita presenti rispettivamente nell'ospite mammifero e nel vettore, vale a dire l'amastigote ed il promastigote (Gramiccia M., 1989). L'amastigote, che si trova in posizione endocellulare (in particolare nel macrofago) nell'ospite vertebrato, è di forma rotondeggiante o ovoidale e di dimensioni tra i 2 e i 5µm di diametro. Il nucleo, grosso ed eccentrico, è addossato alla membrana cellulare; il kinetoplasto, a forma bastoncellare, è adiacente al nucleo ed è assente un flagello libero, presente solo come abbozzo (rizonema). Il promastigote, forma libera e allungata presente nel vettore artropode, è caratterizzato dalla presenza di un flagello che esce dalla parte anteriore del parassita, ed è lungo 15µm (flagello escluso). Il flagello è lungo solitamente quanto il corpo stesso, ad eccezione della forma infettante (promastigote metaciclico) in cui il flagello è molto più lungo rispetto al corpo (Killick-Kendrick J.R., 1986). Il nucleo e il kinetoplasto si rinvergono rispettivamente al centro e all'estremità anteriore, alla base del flagello.

4.2 – Il vettore biologico.

La trasmissione di *Leishmania* spp normalmente richiede un vettore biologico competente all'interno del quale avviene la moltiplicazione del protozoo e la sua trasformazione in promastigote metaciclico infettante. In Italia, *L. infantum* è trasmesso da diverse specie di artropodi del genere *Phlebotomus*. Comunemente i flebotomi sono chiamati anche "pappataci" per il loro volo silenzioso durante la ricerca del pasto di sangue. L'aspetto del flebotomo adulto è quello di un piccolo insetto di color sabbia (sand fly), il cui corpo non supera i 4mm di lunghezza. Alcune caratteristiche fondamentali permettono una loro facile distinzione dagli altri insetti della stessa taglia in quanto sono molto pelosi e mentre pungono, o comunque a riposo, dispongono le ali a V sopra il torace.

In Italia sono quattro le specie di flebotomi capaci di trasmettere *L. infantum*: *Phlebotomus perniciosus* (il più diffuso e dotato della maggiore capacità vettoriale), *Ph.*

perfiliewi, *Ph. ariasi* e *Ph. neglectus*). Solo le femmine sono ematofaghe. Il ciclo biologico (Figura 4) si svolge con una metamorfosi completa con uno stato embrionale di uovo, 4 stadi larvali e uno di pupa. La pupa generalmente rimane attaccata ad un substrato mediante l'esuvia del quarto stadio. Qualunque sia la zona geografica, lo sviluppo delle lave terricole esige una temperatura relativamente costante, una oscurità quasi completa e un mezzo nutritivo formato da materiale organico composto da foglie secche, spoglie di altri insetti, feci di roditori, ecc. Infine, lo sviluppo richiede un grado di umidità relativa vicino alla saturazione. Le larve si possono sviluppare in spaccature del terreno fino a 20-30 cm di profondità o in qualsiasi microambiente con le caratteristiche descritte sopra. L'habitat preferito dai flebotomi è quello secco, con vegetazione a macchia mediterranea, ricco di anfratti (zone tufacee), ad un altitudine di 100-300 m s.l.m. (anche se i flebotomi possono adattarsi anche ad altitudini di poco superiori ai 1000 me). La durata del ciclo di sviluppo dei flebotomi è strettamente legata a fattori climatici. In Italia lo sviluppo viene fortemente rallentato e le larve attraversano l'inverno in diapausa. Durante la stagione calda è stato osservato che possono verificarsi almeno due cicli completi corrispondenti a due generazioni. L'attività ematofaga si concentra nelle ore serali (20.00 – 06.00). In genere non percorrono lunghe distanze dai focolai larvali e sono disturbati dal vento. Le femmine sono normalmente esofaghe e quindi attaccano l'ospite all'esterno (De Carneri I., 1997).

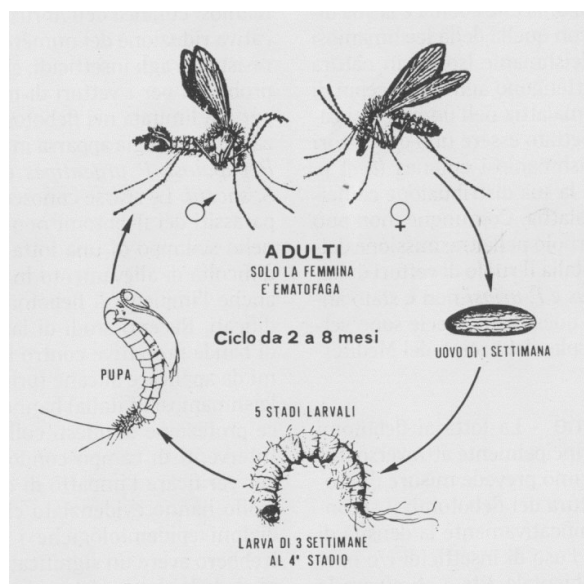


Figura 4. Ciclo biologico di *Phlebotomus* spp. Da De Carneri I., 1997.

4.3 – Ciclo biologico (Figura 5).

A – nell'ospite invertebrato. Il ciclo biologico ha inizio quando una femmina ematofaga appartenente alla Famiglia Psychodidae (generi *Phlebotomus* e *Lutzomyia*) si nutre su un ospite vertebrato infetto (Killick-Kendrick J.R., 1979). Gli amastigoti ingeriti probabilmente si liberano dalle cellule dell'ospite durante il processo di suzione (Lewis D.J., 1975). La trasformazione a promastigote avviene nelle 36 ore successive, anche se si possono osservare degli amastigoti in divisione fino a 43 ore dopo il pasto di sangue (Lainson R. et al., 1988). Successivamente all'ingestione il pasto di sangue viene circondato da una membrana peritrofica prodotta dall'epitelio addominale dell'insetto, a funzione digestiva, fase durante la quale avviene una prima moltiplicazione dei promastigoti. Questi ultimi, una volta terminata la digestione sono liberi e colonizzano l'intestino medio, infiggendo i flagelli nei microvilli delle cellule. In seguito, si assiste ad una migrazione anteriore dei promastigoti, fino a raggiungere l'esofago ed il faringe dell'insetto. Durante quest'ultimo tragitto i promastigoti si riducono di dimensione e non si moltiplicano, pertanto è probabile che l'intestino toracico sia una continua fonte di promastigoti, attratti nella parte anteriore dell'insetto probabilmente per chemiotassi dagli zuccheri del "cropp" dell'insetto (Bray R.S., 1983). A questo punto alcuni parassiti si trasformano in forme metacicliche infettanti per l'ospite vertebrato, altamente mobili, che migrano verso la proboscide; anche in questo caso, trattandosi di forme che non si dividono, la fonte dei parassiti è l'intestino toracico. Dalla proboscide, i promastigoti poi vengono trasmessi all'ospite vertebrato durante la puntura dell'insetto.

Il ciclo nel flebotomo dura 19-20 giorni nel caso di *Leishmania infantum*, ed è fortemente influenzato dalla temperatura esterna; sotto i 10°C il ciclo è inibito, mentre tra i 15 e i 25°C la moltiplicazione del parassita aumenta in maniera proporzionale all'aumento di temperatura (Rioux J.A. et al., 1985). L'umidità ambientale non influenza direttamente il parassita ma solamente la longevità del flebotomo.

B – nell'ospite vertebrato. I promastigoti, rigurgitati dal flebotomo o sopraggiunti con il flusso della saliva dell'insetto, penetrano la cute attraverso il sito della puntura dell'insetto. Avvenuta la trasmissione i promastigoti vengono fagocitati da cellule macrofagiche. I promastigoti aderiscono alla superficie cellulare del macrofago con il

coinvolgimento di recettori specifici sia del parassita che della cellula ospite. I componenti principali della superficie del protozoo sono la glicoproteina ad attività proteasica gp63 e il lipofosfoglicano (LPG), che costituiscono rispettivamente il 10% e il 25% circa delle macromolecole di membrana e che, durante la trasformazione da promastigote ad a mastigote subiscono profonde trasformazioni (Gradoni L. et al., 2004). I promastigoti probabilmente restano negli spazi tissutali circostanti, finchè non fissano il complemento per la via alternativa (Mosser D.M. et al., 1984) o, come scoperto più recentemente, classica (Dominguez et al., 1999). I macrofagi attratti per chemiotassi nel sito dell'inflammation raggiungono i promastigoti e a questo punto avviene un primo processo di adesione parassita-macrofago. Tale processo, del tipo recettore-ligando, può essere siero-dipendente o siero-indipendente; nel primo caso è mediato da opsonine (anticorpi e complemento che adsorbiti sul promastigote si legano ai recettori per Fc e per la frazione C3 del complemento presenti sui macrofagi), nel secondo caso sono coinvolti i glicoconjugati di superficie (la via mannosio/acetilglucosamina) ed è calcio e temperatura-dipendente. L'LPG è in grado sia di rendere i promastigoti resistenti al complemento sia di fissare contemporaneamente la frazione C3 di quest'ultimo (Turco S.J., 1988). La GP63 è legata invece a meccanismi di fissazione alternativa del complemento. Anche la fibronectina di *Leishmania* sembra essere responsabile di uno specifico legame promastigote-macrofago (quest'ultimo possiede recettori specifici per la fibronectina) (Ouaissi M.A., 1988). Per quanto riguarda l'orientamento del contatto promastigote-macrofago, sembra che non ci sia una direzione specifica o costante, ma tale contatto può essere tra testa, corpo e flagello del parassita nella stessa proporzione (Chang K.P., 1979), anche in virtù della natura prettamente fagocitaria dell'internalizzazione del parassita. Il promastigote viene infatti inizialmente circondato dagli pseudopodi del macrofago, che vanno a costituire una struttura lassa ed in seguito alla fagocitosi si assiste alla formazione del fagolisosoma. Nonostante in questo comparto siano attivi tutti i meccanismi di eliminazione dei patogeni di cui dispone il macrofago (radicali liberi dell'ossigeno, acidificazione del contenuto: vedi il sull' capitolo immunità innata), i promastigoti riescono a sopravvivere, probabilmente grazie ad alcune funzioni dell'LPG (inibizione della β -galattosidasi e della proteinasi C, ad esempio o creazione di una barriera alle idrolasi) e ad alcuni dei prodotti degli amastigoti (Handman E., 1999). È

noto comunque che l'attivazione del macrofago da parte dell'IFN γ in animali resistenti possa consentire la distruzione del parassita.

Il processo di trasformazione da promastigote ad amastigote è scatenato dal cambiamento di temperatura e pH e da altri fattori ancora poco noti (Handman E., 1999). Le differenze tra le due forme del parassita, oltre che di tipo morfologico, sembrano essere di tipo più quantitativo che qualitativo (viene fortemente ridotta la sintesi della tubulina) (Gramiccia M., 1987). Per quanto riguarda i processi di divisione degli amastigoti, essa avviene per scissione binaria all'interno del vacuolo parassitoforo, finché non si assiste alla rottura del macrofago. Gli amastigoti liberati vengono poi a loro volta fagocitati (per processi probabilmente diversi rispetto alla fagocitosi dei promastigoti) e continuano a replicarsi all'interno dei macrofagi. La localizzazione cutanea o ematica di cellule infette consente poi al parassita di raggiungere nuovamente l'artropode vettore e di chiudere il suo ciclo (Gradoni L. et al., 2004). Nel cane, in particolare, la forma cronica viscerocutanea risulta altamente infettante in quanto i macrofagi parassitari si localizzano in tutto il derma dell'animale, rendendo così più facile l'assunzione del parassita da parte del vettore.

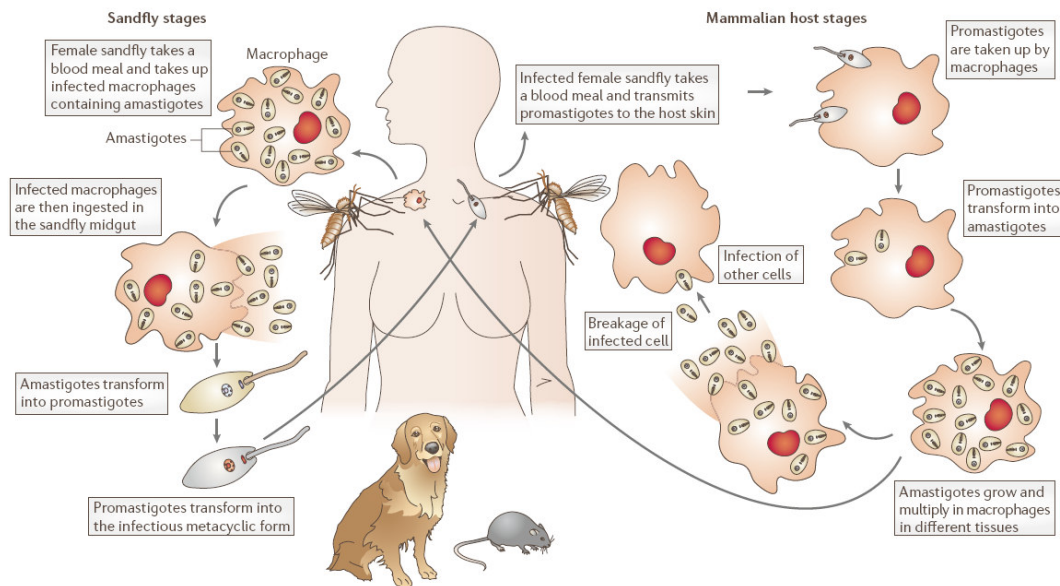


Figura 5. Ciclo biologico di *Leishmania infantum*. Da Lipoldová M. et al., 2006

4.4 – Patogenesi.

A – nella specie canina. Nella LVC la distribuzione del parassita si estende a tutto l'organismo: milza, fegato, linfonodi, midollo osseo, reni, cute, ecc.; nell'uomo invece il parassita si localizza normalmente solo a livello epatico, splenico e di midollo osseo (Tryphonas L. et al., 1977; Marzochi M.C. et al., 1985; Longstaffe J.A. et al., 1986; Swenson C.L. et al., 1988).

Dopo la puntura del flebotomo i parassiti si distribuiscono rapidamente ai linfonodi e alla milza tramite il sangue o la linfa e da lì raggiungono il rene ed il fegato. In seguito, i parassiti si diffondono nel sistema riproduttivo, nella cute, nella vescica, nel tratto digerente, nel sistema respiratorio, ecc. (Molyneux D.H. et al., 1983).

La presenza di parassiti in numerosi tessuti ed organi causa delle reazioni che sono responsabili della comparsa delle lesioni e dei sintomi caratteristici della leishmaniosi canina. Le reazioni infiammatorie proliferative causano un'infiltrazione cellulare che si estende a zone sempre più vaste, provocando così un'alterazione progressiva e uno squilibrio funzionale degli organi colpiti (Bourdeau P. et al., 1988). Contemporaneamente ha inizio una risposta umorale, a partire da una stimolazione policlonale delle cellule B (Galvao-Castro B. et al., 1984; Bunn-Moreno M.M. et al., 1985) che produce elevate concentrazioni di gamma-globuline, comprese immunoglobuline specifiche ed aspecifiche (Persechino A. et al., 1986). In aggiunta a ciò in diverse localizzazioni corporee si formano degli immunocomplessi, costituiti perlopiù da IgG e da frazioni C1, C2 e C4 del complemento (Makni S. et al., Lucena R. et al., 1994).

Le lesioni cutanee sono frequenti e sono associate a diversi tipi di risposte immunitarie. In corso di risposta che porta alla resistenza, è caratteristica la presenza a livello di derma di cellule di Langherans e cheratinociti esprimanti MHCII, di linfociti T, di macrofagi e di parassiti. In corso di risposta che porta alla suscettibilità compaiono lesioni granulomatose in assenza di cellule presentanti l'antigene e con la presenza di numerosi macrofagi infetti (Fondevila D. et al., 1997). Sempre a livello di cute sono stati osservati dei fibroblasti infetti che potrebbero svolgere un ruolo importante nella comparsa delle ulcere (Hervás-Rodríguez J. et al., 1996).

A livello di rene, le lesioni sono caratterizzate da un danno tubulare e glomerulare conseguente alla risposta immunitaria. La glomerulonefrite acuta e la glomerulonefrite

extramembranosa causano un'insufficienza renale come conseguenza del deposito di immunocomplessi (Benderitter T. et al., 1988). Questi immunocomplessi sono formati da IgG anti-*Leishmania* (Mancianti F. et al., 1989). L'alterazione della funzione renale è associata alla circolazione di concentrazioni elevate di immunocomplessi (López R. et al., 1996); cani infetti che producano una scarsa o assente risposta umorale non sviluppano lesioni renali (Nieto C.G. et al., 1992). La presenza di cellule T all'interno delle lesioni renali sembra indicare il coinvolgimento di una risposta cellulare nella glomerulonefrite di origine immunitaria (Costa F.A. et al., 2000).

La morfologia epatica è alterata con la presenza di infiltrati infiammatori e la formazione di granulomi, iperplasia e ipertrofia delle cellule di Kupffer. L'infezione parassitaria induce alterazioni morfologiche negli epatociti, causando modificazioni del sistema endomembrana e del compartimento perossisomale, che esitano in alterazioni del metabolismo epatico (Vianna V.L. et al., 2002).

Nella milza la leishmaniosi canina produce una disorganizzazione della polpa bianca, in cui rimangono pochi linfociti a circondare l'arteriola centrale. La polpa rossa diventa ipercellulare, con le plasmacellule e i macrofagi parassitati nella zona marginale, e la proliferazione delle cellule endoteliali. La capsula e le trabecole risultano ispessite (Tafuri W.L. et al., 2001). I linfonodi manifestano ipertrofia delle regioni corticale e midollare; i centri germinali sono composti da zone di iperplasia dipendenti dai linfociti B e da numerosi macrofagi, mentre l'area delle cellule T è depleta (Tafuri W.L. et al., 2001).

È stato riscontrato che oltre a questi organi ne sono coinvolti molti altri. Il parassita è in grado di colpire le mucose e sono state osservate delle lesioni a livello di lingua, di pene e di cavità orale (Font A. et al., 1996). Gli amastigoti sono in grado di provocare lesioni vascolari che colpiscono le piccole arterie di numerosi organi (cute, tratto gastrointestinale, reni, occhi, polmoni, ecc.) (Pumarola M. et al., 1991). L'infiltrazione di plasmacellule e di macrofagi contenenti amastigoti a livello oculare è causa di lesioni in diverse strutture dell'occhio. La presenza di depositi di IgG come causa di danno alla permeabilità vascolare è stata confermata (García-Alonso M. et al., 1996). Gli amastigoti compaiono nelle cellule muscolari (miofibre), così come i depositi di IgG, causando in tal modo l'atrofia del tessuto muscolare (Vamvakidis C.D. et al., 2000). La meningite causata da *L. infantum* è stata descritta in associazione alla comparsa di

anticorpi specifici per il parassita all'interno del fluido cerebrospinale (Viñuelas J. et al., 2001). Questo danno generale ai tessuti e agli organi dei cani infetti è caratteristico ed assimilabile alla situazione che si presenta in persone coinfecte dall'HIV e da *Leishmania*, descritta negli ultimi anni. L'assenza di difese in questi pazienti umani permette al parassita di diffondersi in localizzazioni atipiche (Alvar J. et al., 1997), il che suggerisce che nel caso del cane una tale situazione è il risultato di una grave immunodepressione indotta dal parassita stesso; un'immunodepressione dapprima specifica nei confronti del parassita e che però in seguito colpisce tutte le funzioni delle cellule T nell'animale colpito (De Luna R. et al., 1999).

B – nell'uomo. Le manifestazioni della leishmaniosi cutanea sono presenti al sito d'inoculo dei promastigoti nella cute (Riley D.S., 1979; Ridley M.J. et al., 1984). Nonostante nell'uomo non siano stati ben definiti gli eventi successivi, si è supposto che accada quanto osservato in studi istopatologici condotti su hamster inoculati per via sottocutanea con promastigoti di *L. donovani*: alcuni promastigoti vengono eliminati dai neutrofili, mentre altri sono fagocitati da macrofagi, lì si convertono ad amastigoti e si moltiplicano (Wilson M.E. et al, 1987). Nel sito d'infezione vengono poi reclutati altri monociti, che poi subiranno a loro volta l'infezione.

Forma cutanea

Nell'infezione cutanea il riscontro più frequente sono i macrofagi repleti di amastigoti (Riley D.S., 1979; Ridley M.J. et al., 1984). Successivamente, si sviluppa una risposta granulomatosa necrotizzante. Compagnono la necrosi focalizzata e l'ulcerazione della cute sovrastante. I meccanismi della necrosi tissutale non sono stati ben definiti ma si ritiene che siano di origine immunomediata. Nel tempo il numero di macrofagi repleti di amastigoti cala ed aumenta la quantità di linfociti. Dopo qualche mese la lesione guarisce, lasciando come segno della malattia una cicatrice piatta e atrofica.

I dati ottenuti dalle infezioni sperimentali degli animali e le osservazioni nell'uomo suggeriscono che gli amastigoti sono in grado di raggiungere i linfonodi tributari nelle fasi precoci dell'infezione. Ciò risulta particolarmente evidente in una sottopopolazione di pazienti infetti da *L. braziliensis*, che prima della comparsa delle lesioni cutanee manifestano adenopatia localizzata, febbre ed altri sintomi sistemici (Barral A et al, 1992; Sousa A de Q et al., 1995). Le colture a partire dal sangue sono risultate positive

in rari casi. Con l'allargarsi e l'ulcerarsi della lesione cutanea, i sintomi sistemici e la linfadenopatia scompaiono. Mesi o anni dopo, una piccola percentuale dei pazienti infetti da *L. braziliensis* o altre specie simili di *Leishmania* sviluppano la leishmaniosi mucosale, che coinvolge naso, faringe o altre strutture mucose (Pearson R.D. et al., 2001).

Esistono due varianti della forma cutanea, la leishmaniosi cutanea diffusa e quella recidivante, poste agli estremi dello spettro di malattia nell'uomo. La forma cutanea diffusa, una variante anergica, è caratterizzata dalla predominanza dei macrofagi ripieni di amastigoti e da una quantità relativamente bassa di linfociti. Le lesioni non si ulcerano e i pazienti colpiti non sviluppano un'immunità di tipo cellulomediato. Le lesioni possono persistere per decine d'anni. La leishmaniosi recidivante è una malattia cronica ulcerativa caratterizzata dalla risposta granulomatosa, con una predominanza dei linfociti e con pochi amastigoti presenti all'interno dei macrofagi. I pazienti infetti sviluppano un'ipersensibilità di tipo ritardato nei confronti degli antigeni di *Leishmania*, ma le lesioni possono persistere per numerosi anni.

Le caratteristiche delle leishmaniosi cutanee sono state comparate a quelle della lebbra. I pazienti affetti da leishmaniosi cutanea diffusa somigliano a quelli colpiti da lebbra lepromatosa, nei quali all'interno dei macrofagi si osservano grosse quantità di micobatteri, mentre il quadro dei pazienti affetti da leishmaniosi recidivante è simile a quello della lebbra tubercoloide, nei quali è presente una risposta granulomatosa che danneggia i tessuti ma sono presenti pochi patogeni. La differenza principale tra le due condizioni è che mentre dall'analisi istopatologica delle lesioni lebbrose è possibile prevedere quale sarà la forma clinica che si svilupperà in seguito, nella leishmaniosi il quadro si evolve verso una predominanza dei macrofagi infetti o dei linfociti solamente in lesioni più vecchie (Ridley M.J. et al., 1984).

Forma viscerale.

La maggior parte dei pazienti infetti da *L. infantum* e da specie simili sono affetti dalla forma viscerale della malattia e presentano infezioni asintomatiche e in grado di risolversi spontaneamente, prive di rilevanza clinica. Negli uomini che sviluppano una forma caratteristica di leishmaniosi viscerale e nel modello dell'hamster siriano (Wilson M.E. et al, 1987) gli amastigoti si disseminano nei fagociti mononucleati di fegato, milza, midollo osseo ed altri organi. Raramente si osservano lesioni cutanee al sito

d'inoculo. Nel momento in cui i monociti vengono reclutati negli organi colpiti e si infettano, si sviluppano imponenti quadri di splenomegalia ed epatomegalia. In pazienti immunodepressi dall'HIV i macrofagi repleti di amastigoti si osservano spesso nel tratto gastrointestinale, nei polmoni ed in altri organi (Pearson R.D. et al., 2001).

4.5 – La risposta immunitaria nella leishmaniosi viscerale canina.

Le manifestazioni della leishmaniosi viscerale (LV) nel cane possono essere molto diverse tra di loro. Cani infetti possono sviluppare infezioni sintomatiche che portano alla morte, mentre altri restano asintomatici o manifestano uno o pochi sintomi lievi e vengono definiti oligosintomatici. Lo spettro delle manifestazioni cliniche della LV progressiva del cane è caratterizzato dalla comparsa di linfadenopatia, anemia, diarrea, alopecia, dermatite, onicogrifosi, perdita di peso, cachessia, problemi alla locomozione, congiuntivite ed epistassi (Ciaramella P. et al., 1997). La LV in forma sintomatica nel cane è stata associata ad alterazioni immunitarie a carico delle cellule T (Barbiéri C.L., 2006). Queste alterazioni comprendono una mancata reazione di ipersensibilità ritardata agli antigeni di *Leishmania* (Cardoso L. et al., 1998; Pinelli E. et al., 1994; Solano-Gallego L. et al., 2000), calo della conta di linfociti T nel sangue periferico (Pinelli E. et al., 1994; De Luna R. et al., 1999; Martínez-Moreno A. et al., 1995), nonché mancata produzione di interferone gamma (IFN- γ) e interleuchina 2 (IL-2) da parte delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) in vitro (Pinelli E. et al., 1994, 1995, 1999; Santos-Gomes et al., 2002). Negli animali sintomatici inoltre è stata evidenziata la presenza di elevati titoli anticorpali anti-*Leishmania*, del tutto privi di attività protettiva (Pinelli E. et al., 1994; Martínez-Moreno A. et al., 1995; Abranches P. et al., 1991). La resistenza alla LV canina è stata associata con l'attivazione di cellule Th1 in grado di produrre IFN- γ , IL-2 e TNF- α (Pinelli E. et al., 1994, 1995). Il principale meccanismo effettore responsabile di una risposta immunitaria protettiva nei cani infetti da *L. infantum* è l'attivazione dei macrofagi da parte di IFN- γ e TNF- α , in grado di uccidere gli amastigoti intracellulari attraverso il pathway L-arginina/ossido nitrico, come è stato osservato in cani successivamente ad una efficace chemioterapia in cani infetti (Vouldoukis I. et al., 1996). La produzione di ossido nitrico (NO) connessa ad un'attività anti-*Leishmania* è stata anche descritta in una linea cellulare macrofagica

infettata con *L. infantum*, in seguito a incubazione con IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Pinelli E. et al., 2000), così come in macrofagi di cane immunizzati con promastigoti inattivati di *L. infantum* (Panaro M.A. et al., 2001). Il ruolo dell'IL-12 nell'induzione e nel mantenimento di una risposta di tipo Th1 sono poco studiate nella LV canina. L'espressione simultanea di IL-12p40, affiancata alla presenza di mRNA trascritti di IL-2 e IFN- γ è stata osservata per un breve periodo di tempo in cani infettati sperimentalmente con *L. infantum*, a indicare che queste citochine sono coinvolte nel ritardo dell'instaurarsi della malattia (Santos-Gomes G.M. et al., 2002). L'IL-12 è stata in grado di provocare un aumento della produzione di IFN- γ da parte di PBMC in cani affetti da forme sintomatiche, naturali e sperimentali, di LV, e perciò sembra essere un buon candidato per la terapia citochinica della malattia (Strauss-Ayali D. et al., 2005). L'IL-12 è stata anche individuata in cellule dei linfonodi di cani protetti nei confronti di *L. infantum* in seguito a immunizzazione con DNA e vettori ricombinanti esprimenti LACK (analogo di *Leishmania* dei recettori per la creatin-chinasi, una proteina di 36kDa ben conservata presente in tutte le specie e gli stadi di sviluppo di *Leishmania*, nonché una delle più immunogene) (Mougneau E. et al., 1995; Ramiro M.J. et al., 2003). Sono stati osservati risultati simili con IL-18 (Chamizo C. et al., 2005; Quinnell R.J. et al., 2001). Il ruolo delle citochine Th2 non è stato ancora ben definito nella LV canina. Mentre nell'infezione umana da *L. chagasi* la produzione di IL-10 è stata correlata alla patologia (Ghalib H.W. et al., 1993), i dati sul coinvolgimento di questa citochina con forme attive di LV canina sono controversi. In cani asintomatici, in PBMC stimulate con l'antigene sono state osservate risposte miste Th1 e Th2, ove è stata dimostrata la presenza di mRNA trascritti di IL-2, IFN- γ e IL-10. Comunque, nei cani asintomatici è stato registrato il predominio di IL-2 e di IFN- γ e lo sviluppo di infezioni sintomatiche non si è potuto correlare all'espressione di IL-10 (Santos-Gomes G.M. et al., 2002; Chamizo C. et al., 2005). In PBMC stimulate con ConA provenienti da cani con segni clinici di LV sono stati evidenziati trascritti mRNA di IL-10 (Pinelli E. et al., 1999). Tutti questi risultati concordano con gli esperimenti nei quali mediante incubazione con una cistin proteinasi ricombinante di *L. chagasi* è stato possibile indurre la produzione di elevati livelli di IL-10 (rilevati con metodica ELISA) da parte di PBMC provenienti da cani affetti da LV sintomatica. In contrasto, in surnatanti di PBMC provenienti da cani oligosintomatici e sintomatici sono state evidenziate,

rispettivamente, concentrazioni basse o non rintracciabili di questa citochina (Pinheiro P.H.C. et al., 2005). In PBMC provenienti da cani controllo infetti e sottoposti a challenge 12 mesi dopo con *L. infantum* sono anche stati riportati trascritti mRNA di IL-10, rispetto a animali non infetti e vaccinati con cistein-proteinasi di tipo I e II (CPB e CPA, rispettivamente) di *L. infantum*, nei quali si è riscontrato un aumento dei trascritti mRNA di IFN- γ (Rafati S. et al., 2005). Nonostante l'IL-10 secreta da cellule T-regulatory CD25+CD4+ sia stata ritenuta coinvolta nella leishmaniosi murina ed umana, nella LV canina il coinvolgimento di queste cellule non è stato ancora studiato. In PBMC fresche di cani asintomatici non è stata osservata la trascrizione di mRNA di IL-4, mentre tale citochina è stata identificata in cani asintomatici stimolati con antigene solubile di *Leishmania* (Solubile *Leishmanial* Antigen, SLA) (Chamizo C. et al., 2005). In cani sintomatici l'espressione di mRNA di IL-4 è stata osservata in PBMC stimulate con fitogeno (Pinelli E. et al., 1999) e l'mRNA di IL-4 è stato rinvenuto da aspirati di midollo osseo di cani presentanti sintomatologia grave (Quinnell R.J. et al., 2001). La misurazione dell'IL-4 con metodica ELISA in surnatanti di PBMC di cane stimolati con cistein-proteinasi ricombinante di *L. chagasi* ha permesso di rilevare livelli significativi di questa citochina in surnatanti di cani sintomatici ma non in surnatanti di cani asintomatici o oligosintomatici (Pinheiro P.H.C. et al., 2005). Le sottoclassi anticorpali IgG1 e IgG2 sono state impiegate come indicatore più accurato dello status della LVC rispetto alle IgG totali (Deplazes P. et al., 1995). È stata infatti individuata una correlazione diretta tra l'induzione di alti livelli di anticorpi anti-*Leishmania* di tipo IgG1 e la comparsa dei segni clinici in cani con infezione da *L. infantum*, mentre la presenza di anticorpi di tipo IgG2 è stata associata a forme asintomatiche dell'infezione (Nieto G. et al., 1999). In ogni caso questi risultati non sono stati confermati da altri studi in cui cani con reazioni cutanee positive di ipersensibilità ritardata hanno manifestato una risposta immunitaria polimorfica, variabile tra casi di sieronegatività fino a titoli positivi di IgG1 o IgG2 (Solano-Gallego L. et al., 2000; Bourdoiseau G. et al., 1997). Livelli elevati di IgG2 sono stati rinvenuti in cani sintomatici (Leandro C. et al., 2001) e in cani brasiliani naturalmente infetti si è osservata una up-regulation di tutte le classi di IgG, nonostante le IgG2 fossero elevate in maniera minore (Quinnell R.J. et al., 2003). Più recentemente, è stato dimostrato che in cani sintomatici provenienti da diverse aree endemiche è presente un'elevato titolo di IgE, accanto alle

IgG1, il che renderebbe le prime potenziali markers di infezioni attive (Almeida M.A.O. et al., 2005; Iniesta L. et al., 2005).

Solamente pochi studi hanno dimostrato il coinvolgimento di linfociti CD8+ nella resistenza alla LVC. Questo tipo di linfociti sono stati individuati in cani asintomatici infettati sperimentalmente con *L. infantum*, ma non negli animali sintomatici, suggerendo in tal modo che la lisi diretta dei macrofagi infetti da *L. infantum* da parte dei linfociti T citotossici possa essere ulteriore meccanismo effectore della resistenza alla LVC (Pinelli E. et al., 1995). In cani naturalmente infetti con *L. infantum* è stata osservata una riduzione sia della popolazione CD4+ che CD8+ e il ripristino di valori fisiologici è avvenuto solamente dopo il trattamento farmacologico (Bourdoiseau G. et al., 1997). Il coinvolgimento dei CD8+ nella LVC è stato suggerito in maniera indiretta in due studi in cui i cani venivano immunizzati o con DNA codificante DNA-LACK o con DNA codificante le cistein-proteinasi CPA e CPB di *L. infantum* (Ramiro M.J. et al., 2003; Rafati S. et al., 2005). In entrambe gli studi agli animali oltre al DNA era stato effettuato un trattamento booster con vaccinia virus ricombinanti che esprimevano rispettivamente il LACK o le CPA e CPB ricombinanti. Infatti, risultati precedenti hanno dimostrato che le cellule CD8+ attivate dopo l'immunizzazione con il DNA potrebbero essere stimulate ulteriormente con una proteina ricombinante virale o con un boost proteico (Kirman JR et al., 2003). I principali meccanismi coinvolti nella risposta immunitaria del cane nei confronti di *L. infantum* sono schematizzati nella Figura 6.

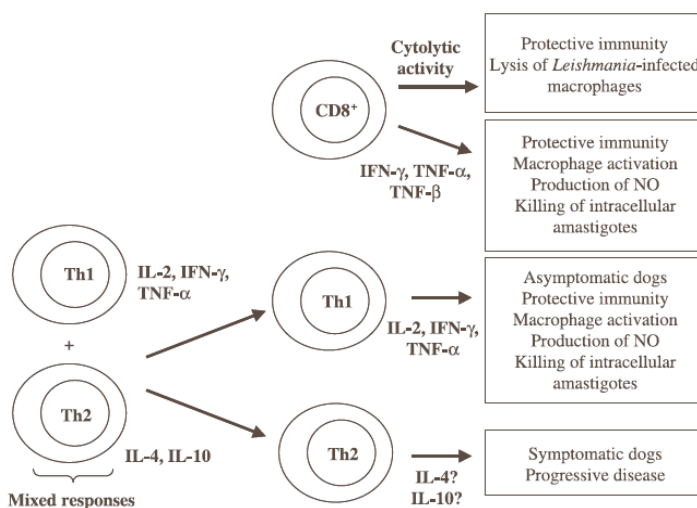


Figura 6. Schema della regolazione immunitaria da parte delle diverse tipologie Th e delle cellule T citotossiche nella leishmaniosi viscerale canina. Da Barbiéri C.L., 2006.

4.6 – Le cellule dendritiche e *Leishmania*.

È importante premettere che la letteratura presente sull'interazione tra DC e *Leishmania* si basa su studi nei quali sono state impiegate metodiche e approcci sperimentali spesso diversi (ad esempio, modello murino o modello umano, diversi siti d'inoculo, diversi sottotipi di DC, DC mature o immature, diverse specie o stadi di *Leishmania*); tutte le conclusioni che si possono trarre da queste ricerche devono pertanto essere prese con precauzione (Garg R. et al., 2007).

Recentemente, è stato dimostrato, a proposito dei recettori delle lectine di tipo C (C-type lectin receptors, CLR), che il DC-SIGN (dendritic cell specific ICAM-3-grabbing non-integrin) è impiegato dagli amastigoti di *Leishmania* per l'ingresso del protozoo nelle cellule dendritiche (Colmenares M. et al., 2002). DC-SIGN è un recettore che mediante l'interazione con ICAM-3 potrebbe svolgere un importante ruolo nella stabilizzazione dei contatti intercellulari ed in particolare potrebbe mediare un efficiente inserimento del TCR nonché la proliferazione delle cellule T “a riposo” indotta dalle DC (Grakoui A. et al., 1999; Geijtenbeek T.B. et al., 2000). L'interazione dei patogeni con DC-SIGN potrebbe pertanto alterare la presentazione antigenica e la produzione di citochine per permettere la persistenza del patogeno all'interno delle DC. Un'altra possibile conseguenza del legame patogeno-DC-SIGN è lo shift verso una risposta di tipo Th2, con evidenti ripercussioni sul tipo di risposta evocata (Relloso M. et al., 2002). Si ritiene che i patogeni che interagiscono con DC-SIGN agiscano sulla maturazione delle DC e sulle loro funzioni interferendo con gli eventi di signaling mediati dai TLR (Garg R. et al., 2007). L'avidità di *Leishmania* per DC-SIGN è direttamente proporzionale alla maturazione del parassita ed è maggiore nei confronti di parassiti non-opsonizzati rispetto a quelli opsonizzati (Caparrós E. et al., 2005, Colmenares M. et al., 2004). Il legame degli amastigoti di *L. infantum* con le DC non sembra influenzare l'espressione delle molecole CD83, CD86 e MHCII, tutte considerate markers di maturazione (Caparrós E. et al., 2005). Il mannano (ligando naturale di DC-SIGN) è in grado di bloccare solo in parte il legame *Leishmania*-DC-SIGN, e ciò può essere dovuto sia al fatto che i siti di legame di DC-SIGN impiegati da *Leishmania* sono diversi da quelli occupati dal mannano, sia al fatto che *Leishmania*

presenta maggior affinità rispetto a quest'ultimo (Garg R. et al., 2007). È possibile che l'espressione di superficie del DC-SIGN, localizzata solitamente a livello di microdomini lipidici detti "lipid rafts", sia alterata nelle DC infette, dal momento che l'infezione di macrofagi murini con *Leishmania* è in grado di inibire la presentazione antigenica proprio tramite la disorganizzazione dei lipid rafts (Chakraborty, D. et al., 2005). È ancora comunque lontana la comprensione del significato dell'interazione *Leishmania*-DC-SIGN e delle sue conseguenze (ad oggi esistono esclusivamente delle ipotesi: diminuita intensità della risposta immunitaria, distruzione dei parassiti internalizzati...).

L'uptake di *Leishmania major* dipendente dalle DC richiede un'iniziale opsonizzazione del parassita con immunoglobuline specifiche. In seguito, questi complessi anticorpo-parassita si legano alle DC mediante i recettori FcγI e FcγIII (Woelbing, F. et al., 2006). Non si sa se lo stesso meccanismo sia effettivo nei confronti delle specie causa di leishmaniosi viscerale.

Per quanto riguarda il ruolo dei TLR, sembra che i TLR siano coinvolti nella maturazione delle DC indotta da *Leishmania*. In topi knock out per MyD88 (adapter per la trasduzione dei segnali della famiglia di recettori TLR/IL-1) la maturazione delle DC indotta da *Leishmania donovani* è parzialmente inibita (De Trez, C. et al., 2004). Inoltre, in topi privi di MyD88 tende a svilupparsi una risposta di tipo Th2, contraddistinta dalla maggior suscettibilità all'infezione da *L. major* (Garg R. et al., 2007).

Per quanto riguarda le citochine secrete dalle DC, sono state considerate prevalentemente IL-4, IL-10 e IL-12. Nelle prime ricerche svolte era stato dimostrato che l'IL-4 contribuisce allo sviluppo della malattia cutanea causata da *L. mexicana* e *L. amazonensis* in topi Balb/c (Alexander, J. Et al., 2002), mentre in studi più recenti sembra che tale citochina non abbia favorito lo sviluppo della leishmaniosi viscerale murina causata da *L. donovani* (Satoskar, A. et al., 1995) e potrebbe addirittura avere avuto un ruolo protettivo (Stäger, S. et al., 2003). Per quanto riguarda l'IL-10, secreta sia dalle DC che dalle cellule Th2, sembra che *Leishmania* tragga vantaggio dagli effetti antinfiammatori e inibitori delle molecole costimolatorie delle DC per moltiplicarsi in maniera incontrollata. Tra gli altri effetti dell'IL-10 è stato anche descritto il blocco del trasporto dei complessi MHCII-peptidi verso la membrana

plasmatici delle DC (Koppelman, B. et al., 1997). Una delle principali caratteristiche della LV, la patologia splenica, è stata sperimentalmente associata alla produzione di elevati livelli di TNF α e IL-10 (Stanley, A.C. et al., 2007). I livelli di IL-4, IL-5 e IL-10 restano comunque bassi in DC messe a contatto con degli amastigoti (Ghosh, M. et al., 2006). Alcune specie di *Leishmania* stimolano la produzione di IL-12 attraverso i recettori CD40 di superficie, e tale processo è determinante per il decorso dell'infezione. Da esperimenti in vitro è stato osservato che in seguito al contatto tra le DC e *Leishmania donovani* viene rilasciato immediatamente un certo quantitativo di IL-12 presumibilmente preformata (Ghosh, M. et al., 2004). Sulla base delle informazioni provenienti dal modello murino sembra che l'IL-12 svolga un ruolo chiave della patogenesi dell'infezione da *Leishmania*; tali osservazioni attendono di essere confermate o smentite per quanto riguarda l'uomo (Garg R. et al., 2007). Ad esempio, è stato riportato da alcuni Autori (McDowell, M.A. et al., 2005) che l'infezione con *Leishmania donovani* di DC derivate dal sangue periferico umano non porta ad un aumento della produzione di IL-12 CD40 dipendente. Altri Autori hanno descritto come DC umane incubate con promastigoti di *L. donovani* non abbiano incrementato la produzione di citochine, mentre hanno osservato come la co-cultura delle stesse DC con amastigoti è stata in grado di causare un lieve aumento della secrezione di citochine infiammatorie, compresa l'IL-12 (Ghosh, M. et al., 2006).

È stato dimostrato che le DC mieloidi umane sono suscettibili all'infezione con amastigoti di *L. donovani*, sia opsonizzati che non, isolati da hamster (Ghosh, M. et al., 2006). In tali esperimenti, l'infezione delle DC ha causato la maturazione delle DC mieloidi umane, dimostrata dall'upregulation di diverse molecole e recettori (HLA-ABC, HLA-DR, CD40, CD54, CD80, CD83, CD86, CD11c e CCR7), nonché dal rilascio di specifiche citochine (Ghosh, M. et al., 2006). Inoltre, le DC mieloidi umane infette con amastigoti sono state in grado di indurre una risposta di tipo Th1 quando messe in co-cultura con cellule T CD4+ naive allergeniche e con cellule T CD4+ autologhe di pazienti affetti da kala-azar (Ghosh, M. et al., 2006). Inoltre, tali DC esposte agli amastigoti hanno secreto citochine infiammatorie in seguito al trattamento con IFN γ o con anticorpi monoclonali anti CD40 (Ghosh, M. et al., 2006). È interessante come i promastigoti della stessa specie di *Leishmania* non siano stati in grado di indurre la maturazione delle DC mieloidi umane, probabilmente perché

presentano un grado diverso di internalizzazione. È comunque stato riportato che amastigoti di *L. infantum* non opsonizzati non sono stati in grado di indurre la maturazione di DC di derivazione monocitaria (Caparrós E. et al., 2005). Sulla base di queste informazioni è possibile dedurre che specie diverse di *Leishmania* interagiscono con recettori differenti sulla superficie, almeno per quanto riguarda le DC mieloidi umane.

Al pari di quanto accade nei macrofagi, anche nelle DC *Leishmania* è in grado di internalizzare e degradare i complessi MHCII-peptide impiegando le loro proteasi lisosomali (Antoine J.C. et al., 2004). In tal modo, *Leishmania* può interferire con i processi di presentazione antigenica. È stato riportato inoltre che l'espressione di antigeni lipidici e glicolipidici, che avviene mediante recettori CD1a, CD1b, CD1c, viene inibita in seguito all'infezione delle DC umane con *L. donovani* (Amprey J.L. et al., 2004). Al contrario, l'infezione di DC umane immature con *L. infantum* ha dato luogo ad un'aumento dell'espressione superficiale di CD1d, fenomeno che a sua volta facilita il riconoscimento e l'eliminazione di queste DC da parte di cellule "invariant" NKT, produttrici di IFN γ (Campos-Martín Y. et al., 2006).

5 – PARTE SPERIMENTALE.

5.1 – La linea cellulare DH82 come modello di cellula istiocitaria.

INTRODUZIONE

La presente ricerca si è posta l'obiettivo di studiare le interazioni tra le cellule presentanti l'antigene (APCs) e *Neospora caninum*, per poter comprendere meglio quali sono le conseguenze del primo contatto tra l'ospite e il parassita e quindi l'esito immunopatogenetico. In particolare, vista la difficoltà di ottenere da animali vivi grossi quantitativi di sangue per poter disporre di DC o di APCs, si è tentato in primo luogo di disporre di un modello di questo tipo cellulare; tale modello è stato identificato nella linea cellulare di cane DH82.

Il modello DH82 – La linea cellulare DH82 è stata ottenuta da progenitori neoplastici di una istiocitosi maligna del cane, una rara forma di proliferazione neoplastica di istiociti atipici. La prima caratterizzazione della linea cellulare, riportata nella descrizione della stabilizzazione della linea cellulare, era stata condotta con diverse metodiche, quali microscopia ottica ed elettronica, citochimica e saggi funzionali per osservare la capacità di fagocitosi e produzione di interleuchine (Wellman M.L. et al., 1988). In questa prima descrizione tali cellule sembravano scarsamente aderenti, rotondeggianti (25-55µm di diametro nell'80% dei casi, 40-50µm di diametro nel restante 20%), con citoplasma basofilo e abbondante e presenza di granuli eosinofili. Erano anche presenti vacuoli e pseudopodi citoplasmatici; è stato inoltre osservato che tali cellule erano in grado di fagocitarsi tra di loro in coltura. Per quanto riguarda il nucleo, appariva irregolare, eccentrico e dotato in qualche caso di più di un nucleolo. Nelle cellule di maggiori dimensioni erano stati osservati da 1 a 13 nuclei. A livello di espressione di superficie, le cellule DH82 erano risultate positive alla presenza di recettori Fcγ (81% delle cellule) e negative per i recettori Fcμ, C3b e alla presenza di immunoglobuline di superficie. Le cellule (il 95%) si sono dimostrate in grado di fagocitare piccole particelle di latex rivestite di IgG, ma solo l'1% delle cellule ha fagocitato eritrociti di cane. Non

sono state dimostrate attività di natural killing e in un saggio biologico su timociti murini tali cellule non hanno prodotto IL-1 in seguito alla stimolazione con LPS (Wellman M.L. et al., 1988). In una descrizione più recente è stato riportato che le cellule DH82 sono in grado di produrre IL-6 e TNF α (con o senza stimolazione con LPS), nonché di esprimere costitutivamente gli mRNA di IL-1, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF α . Per quanto riguarda l'espressione di markers di superficie esaminati in citometria, queste cellule esprimevano CD14 (75%), CD5 e CD45 (50%) e sono state definite “negative” per l'espressione di MHCII (4,3%) (Barnes A. et al., 2000). Uno studio successivo ha riportato una positività dell'84% delle cellule DH82 a MHCI e una positività del 47% delle stesse cellule a MHCII. Tale studio è stato condotto su cellule DH82 infette e non infette da *Ehrlichia canis*, visto che tale linea cellulare è stata finora impiegata perlopiù come substrato per la propagazione in vitro di tale batterio (Harrus S. et al., 2003). Per quanto riguarda le applicazioni della linea in ambito strettamente parassitologico, solo recentemente è stata dimostrata la possibilità di infettare tale linea cellulare con promastigoti di *L. infantum*, anche se con scarsa efficienza (meno del 50% delle cellule infette) e con bassa intensità (150 amastigoti in 100 cellule) (Maia C. et al., 2007).

5.1.1 – Valutazione dell'espressione di markers immunologici della linea cellulare DH82.

La prima fase della ricerca aveva l'obiettivo di caratterizzare l'espressione dei recettori di superficie delle cellule DH82, sia per recettori le cui frequenze di espressione erano già presenti in letteratura, sia per recettori ancora non esaminati (quali quelli del gruppo CD1 – caratteristici delle DC e legati alla presentazione di antigeni non proteici – nonché il CD18, integrina di adesione agli endoteli), per poi selezionare i marker più attendibili esaminare le alterazioni a livello di recettori di superficie causati dall'infezione con *N. caninum*.

MATERIALI E METODI

Coltivazione DH82 – Le cellule DH82, gentile dono del Prof. G. Donofrio (Università di Parma) sono state coltivate in terreno E-MEM con aminoacidi essenziali (Cambrex BioSciences), supplementato con L-glutamina (stock 200mM, concentrazione finale 0,2mM), penicillina (stock 10000UI/ml, concentrazione finale 100UI/ml), streptomicina (stock 10000µg/ml, concentrazione finale 100µg/ml) e anfotericina B (stock 25µg/ml, concentrazione finale 0,25µg/ml) (Cambrex BioSciences) supplementato con 10% di siero fetale bovino (Fetal Bovine Serum, Cambrex BioSciences). Tale terreno sarà in seguito definito EMEM completo. Le stesse quantità di L-glutamina, di antibiotico e antimicotico, salvo diverse indicazioni, sono state impiegate anche per l'allestimento di terreni completi basati sull'impiego di terreno RPMI 1640. Per la propagazione delle cellule sono state impiegate flask di diverse dimensioni (25, 75 e 175cm²) a seconda delle necessità; per la valutazione dell'espressione dei marker di superficie sono state impiegate delle Chamberslides (Nunc, Italia), che permettono alle cellule di crescere direttamente sui vetrini.

In ciascun pozzetto delle chamberslide (8 pozzetti ciascuna) sono state seminate $8,5 \times 10^4$ cellule DH82 in 500µl di EMEM completo. Quando le cellule hanno raggiunto la confluenza in ciascun pozzetto delle chamberslide, sono state rimosse le gabbiette che contenevano il terreno di coltura; i vetrini sono stati successivamente lavati in PBS, lasciati asciugare e poi fissati in etanolo puro a -20°C per 10 minuti. In seguito, i vetrini sono di nuovo stati asciugati a temperatura ambiente e conservati a -20°C fino all'esecuzione dell'immunocitochimica.

Anticorpi e immunocitochimica – Sono stati impiegati anticorpi monoclonali primari, tutti sviluppati nel topo e specifici per la specie canina:

anti-CD1c (Clone CA13.9H11, IgG1, Serotec, UK), alla diluizione 1:10
anti-CD1a (Clone CA9.AG5, IgG1, Serotec, UK), alla diluizione 1:10
anti-CD45 (Clone 12.10C12, IgG1, Serotec, UK), alla diluizione 1:10
anti-CD45RA (Clone CA4.1D3, IgG1, Serotec, UK), alla diluizione 1:10
anti-CD18 (Clone CA1.4E9, IgG1, Serotec, UK), alla diluizione 1:10
anti-MHCII (Clone CA2.1C12, IgG1, Serotec, UK), alla diluizione 1:10

Per l'esecuzione dell'immunocitochimica, i vetrini provenienti dalle chamberslide sono stati presi dal congelatore a -20°C , portati a temperatura ambiente e si è attesa l'evaporazione della condensa. Nel frattempo, i reagenti per l'immunoperossidasi (Kit LSAB Plus, DakoCytomation, Italia) sono stati estratti dal refrigeratore ($+4^{\circ}\text{C}$) poiché devono essere utilizzati a temperatura ambiente ed è stata preparata una camera umida (composta da una scatola portavetrini con all'interno della carta assorbente inumidita) per le incubazioni.

I vetrini sono stati immersi in xylene puro per 30 minuti, durante i quali sono state preparate una soluzione di H_2O_2 al 2.5% (per eliminare eventuale presenza di perossidasi endogene) in acqua distillata, una soluzione di siero di maiale diluito 1:10 (per saturare i siti aspecifici, visto che l'anticorpo secondario biotinilato è prodotto nella specie suina) e le soluzioni degli anticorpi primari. Queste ultime due soluzioni sono state preparate in PBS, per garantire l'isotonicità con le cellule durante le incubazioni.

In seguito i vetrini sono stati reidratati mediante passaggi seriali di 5 minuti ciascuno (I xylene -> II xylene -> I etanolo 100° -> II etanolo 100° -> acqua distillata). Dopo il passaggio in acqua distillata i vetrini sono stati incubati per 10 minuti nella soluzione di H_2O_2 al 2.5%, e successivamente sono stati sottoposti a 2 lavaggi in PBS, ciascun lavaggio della durata di 5 minuti. Dopo tali lavaggi, ciascuno spot del vetrino della chamberslide è stato circoscritto con un pennarello idrorepellente (Liquid Blocker, Super PAP PEN, Bio Optica, Italia) e in seguito ciascuno spot è stato ricoperto con $100\mu\text{l}$ di siero di maiale al 10%, e poi i vetrini sono stati incubati per 20 minuti nella camera umida, a temperatura ambiente. Trascorso questo tempo, il siero suino è stato sgocciolato e ciascuno spot (tranne quello di controllo negativo, ove è stato posto del solo PBS) è stato direttamente ricoperto con $100\mu\text{l}$ di anticorpo primario per 30 minuti a temperatura ambiente all'interno della camera umida. Successivamente, i vetrini sono stati sottoposti a 2 lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS, e incubati poi con il reagente Biotin Link del kit LSAB Plus (trattasi dell'anticorpo secondario coniugato alla biotina; è stata impiegata una goccia per ogni spot) per 15 minuti a temperatura ambiente all'interno della camera umida. Trascorsa quest'incubazione i vetrini sono stati nuovamente sottoposti a 2 lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS e poi incubati con il reagente Streptavidin-HRP (streptavidina coniugata alla Horseradish peroxidase; è stata

impiegata una goccia per ogni spot) del kit LSAB Plus per altri 15 minuti a temperatura ambiente all'interno della camera umida. Dopo quest'incubazione i vetrini sono stati nuovamente sottoposti a 2 lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS e poi è avvenuta l'incubazione con il reagente cromogeno β -ammino-9-etil-carbazolo (AEC, DakoCytomation, Italia); è stata impiegata una goccia per ogni spot), in grado di dare luogo a una reazione colorimetrica in caso di avvenuto legame antigene-anticorpo. Lo sviluppo della reazione è stato osservato al microscopio ottico, e la reazione stessa è stata fermata con due lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS quando è stata ritenuta soddisfacente nei diversi spot presenti sul vetrino; ciò solitamente si è verificato dopo 5 minuti di incubazione con il cromogeno. A testimoniare la specificità dei segnali osservati è stata riscontrata la costante assenza di segnale nello spot ove era stato omesso l'anticorpo.

Dopo l'arresto della reazione colorimetrica i vetrini sono stati sottoposti a controcolorazione dei nuclei con ematossilina per 2 minuti, seguiti da 10 minuti di incubazione dei vetrini in acqua di fonte corrente per stabilizzare la colorazione dei nuclei. Come ultimo passaggio e per permettere l'osservazione e la conservazione dei preparati i vetrini sono stati montati con montaggio acquoso (Bio Mount, Bio Optica, Italia).

Citofluorimetria a flusso – Per procedere all'analisi dell'espressione in citometria a flusso dei marker di superficie si è proceduto al distacco delle cellule DH82 propagate in flask da 75cm², mediante un reagente non enzimatico – il Cell Dissociation Solution (Sigma Aldrich, Italia), in modo da ridurre al minimo le alterazioni indotte dal tradizionale distacco con tripsina. Successivamente al distacco le cellule DH82 sono state contate e distribuite in aliquote da 5x10⁵ cellule per ciascuna marcatura da effettuare. Gli anticorpi impiegati sono stati i seguenti (sviluppati in topo anch'essi):

anti-CD1c (Clone CA13.9H11, IgG1, Serotec, UK), usato puro
anti-CD45 (Clone 12.10C12, IgG1, Serotec, UK), usato puro
anti-CD18 (Clone CA1.4E9, IgG1, Serotec, UK), usato puro
anti-MHCII (Clone CA2.1C12, IgG1, Serotec, UK), usato puro
anti-MHCII (Clone TH14B, IgG2a, VMRD, USA), specifico per numerosi mammiferi, compreso il cane, usato diluito 1:10
anti-MHCII (Clone TH81A5, IgG2a, VMRD, USA) specifico per numerosi mammiferi, compreso il cane, usato diluito 1:10
anti-CD14 (Clone CAM36A, IgG1, VMRD, USA) specifico per numerosi mammiferi, compreso il cane, usato diluito 1:10

Ciascun campione di cellule è stato centrifugato a 1800RPM (320g) per 5 minuti, e successivamente risospeso in 100µl di PBS supplementato con l'1% di siero fetale bovino, dopodichè è stato incubato con l'anticorpo primario alle diluizioni sopra riportate per 15 minuti. In seguito, è stato effettuato un lavaggio con PBS supplementato con l'1% di siero fetale bovino e dopo un passaggio in centrifuga sempre a 1800RPM per 5 minuti è stata effettuata l'incubazione con l'anticorpo secondario coniugato FITC (Goat Anti-Mouse IgG (γ), Caltag, USA) per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. Successivamente, dopo un ultimo lavaggio con PBS supplementato con l'1% di siero fetale bovino è stata effettuata la lettura con il citofluorimetro (EPICS® XL MCL, Beckman Coulter, USA). I risultati sono stati espressi in termini di percentuale di cellule positive a partire dal confronto tra il valore rilevato nelle cellule non marcate (valore background) e quello rilevato nelle cellule marcate con anticorpo.

RISULTATI

Immunocitochimica – I risultati delle marcature mediante immunocitochimica dei markers di superficie considerati sono descritti nelle figure successive (S1-S6). In generale, per alcuni marker non è stato possibile osservare alcun tipo di positività (CD1a, CD45RA, MHCII), mentre per altri è stato possibile osservare positività diffuse (CD1c, CD45) o puntiformi a livello citoplasmatico (CD18).

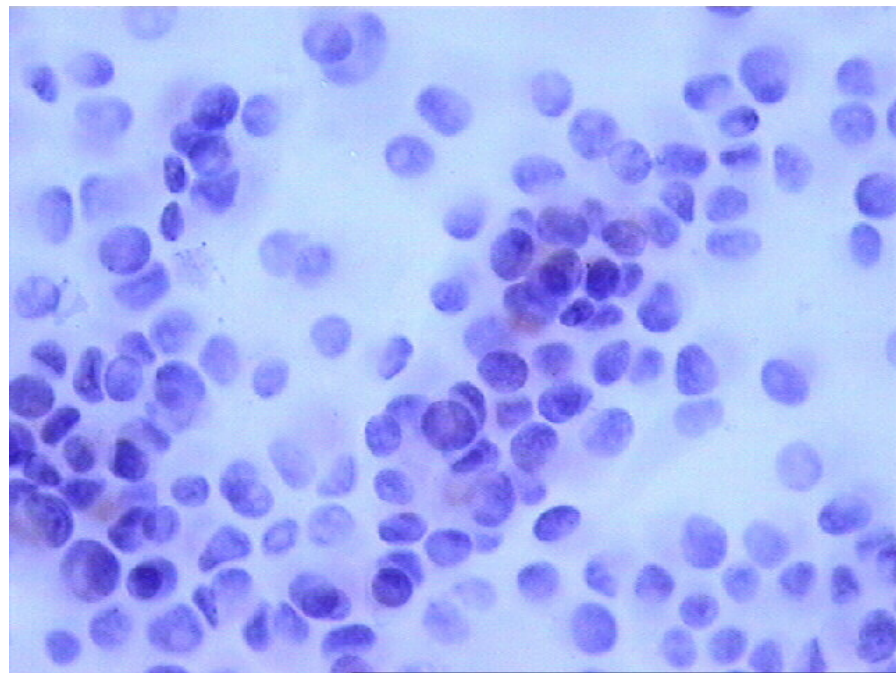
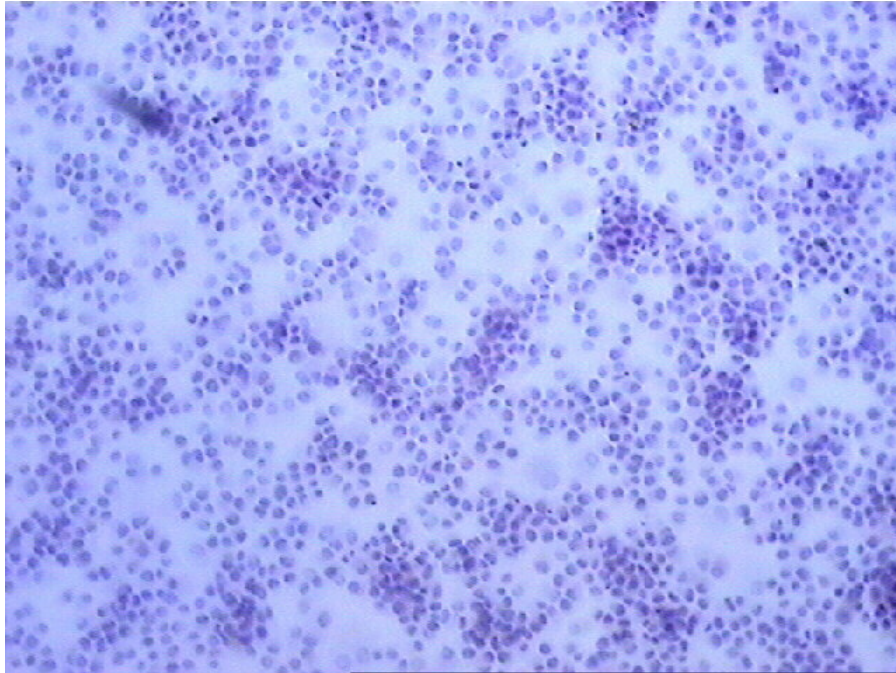


Figura S1: Immunocitochimica delle cellule DH82 effettuata con anticorpo anti-CD1a di cane; si noti l'assenza di segnale sia a piccolo (10x, in alto) che a forte ingrandimento (40x, in basso).

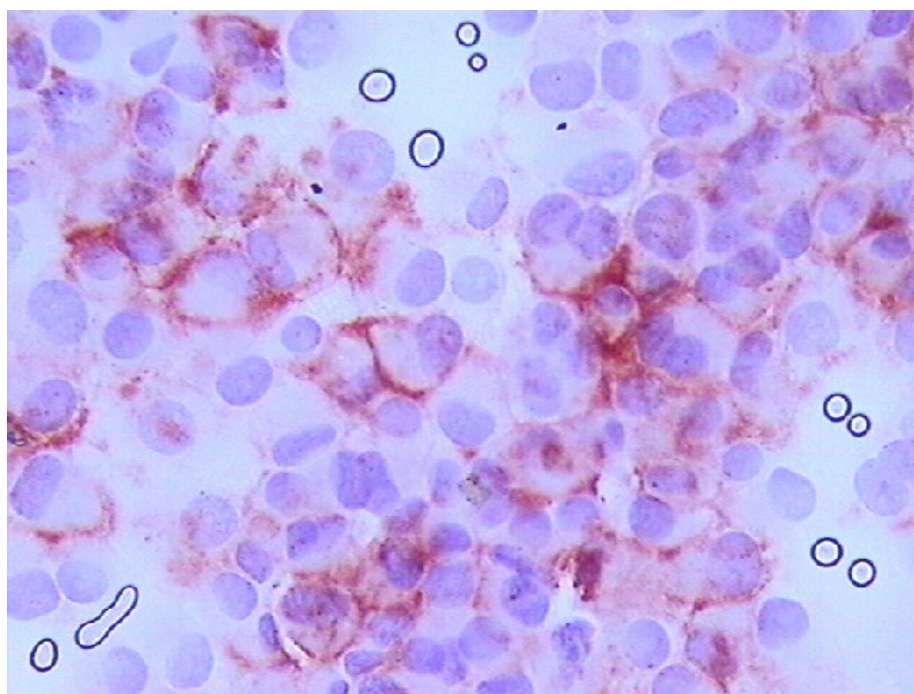
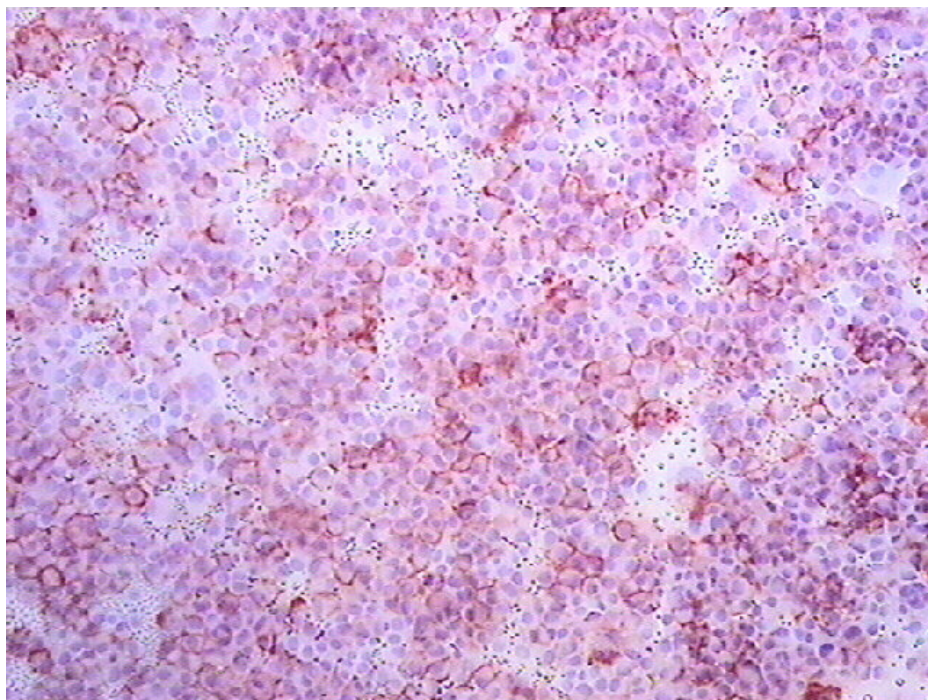


Figura S2: Immunocitochimica delle cellule DH82 effettuata con anticorpo anti-CD1c di cane; si noti la positività diffusa, soprattutto a livello citoplasmatico (10x, in alto; 40x, in basso).

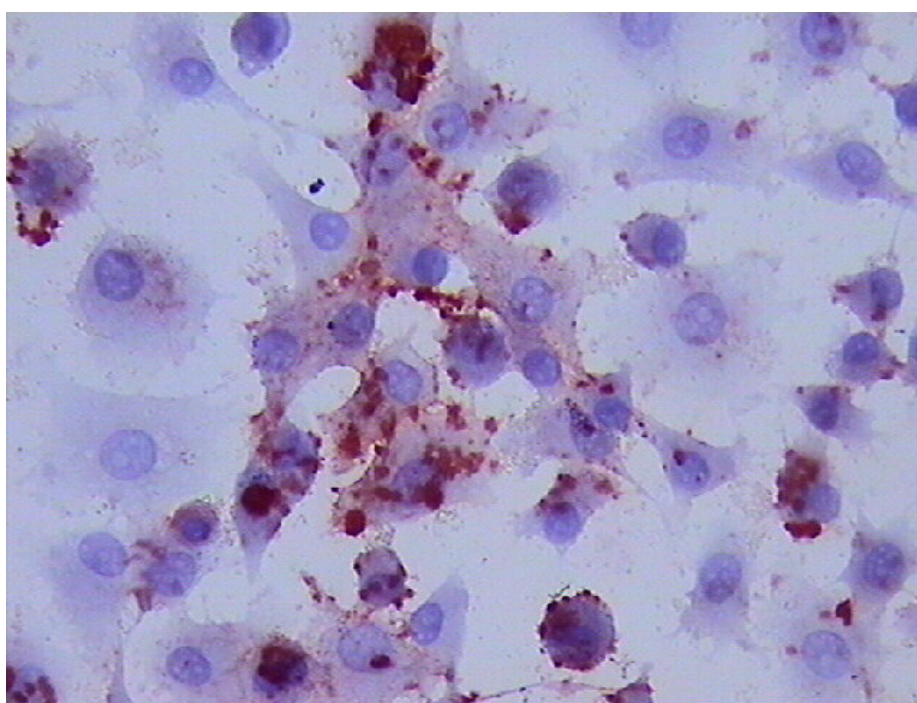
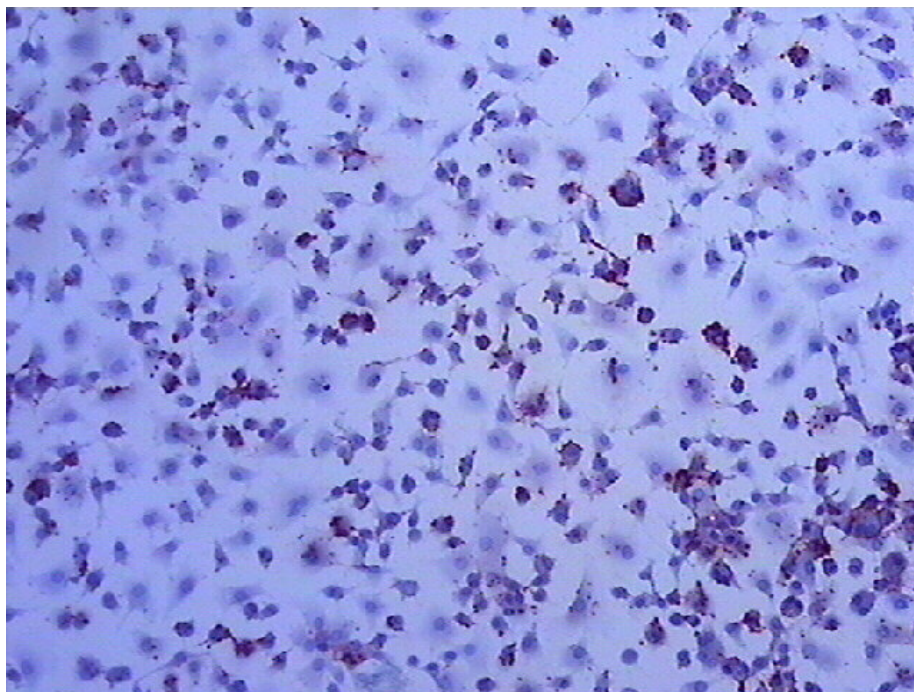


Figura S3: Immunocitochimica delle cellule DH82 effettuata con anticorpo anti-CD18 di cane; si noti la positività localizzata in corrispondenza di cluster cellulari, e in particolare presente in maniera puntiforme a livello citoplasmatico (10x, in alto; 40x, in basso).

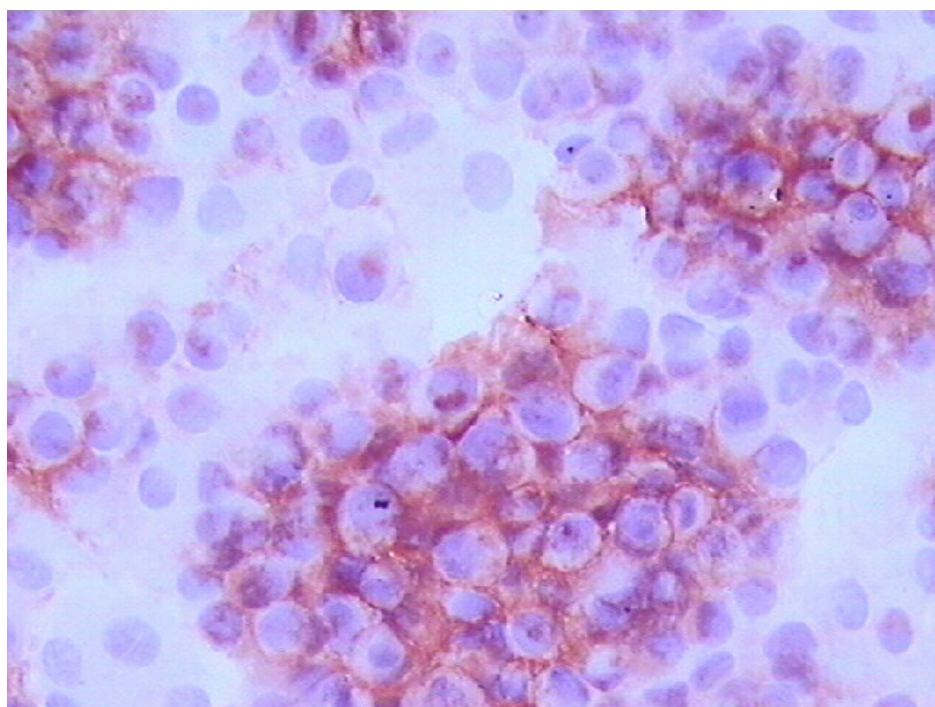
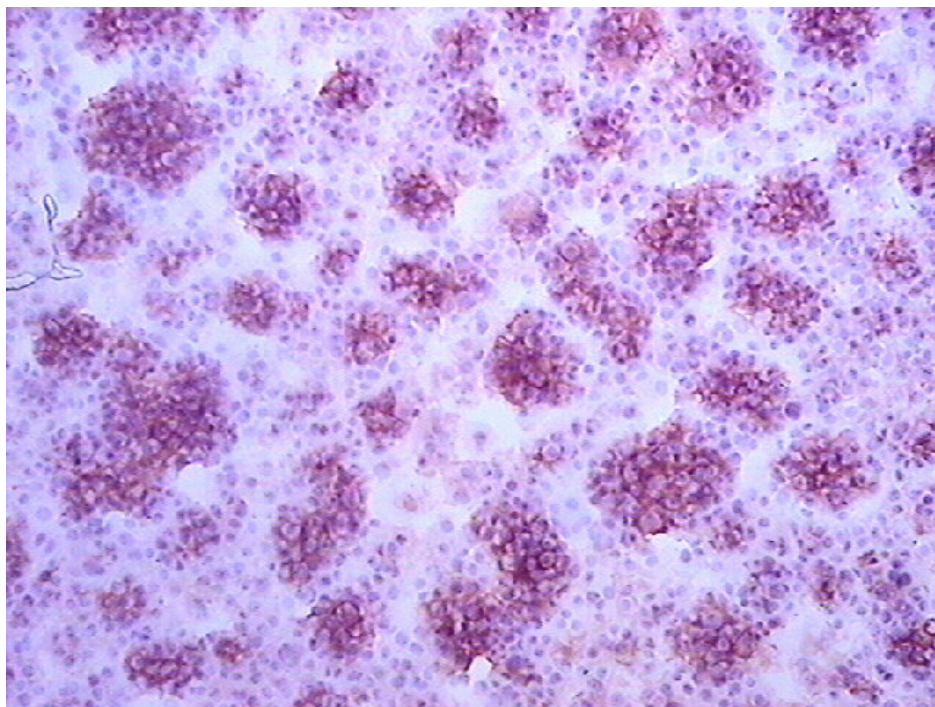


Figura S4: Immunocitochimica delle cellule DH82 effettuata con anticorpo anti-CD45 di cane; si noti la positività diffusa ma accentuata in alcuni cluster cellulari; le cellule positive risultano tali diffusamente a livello citoplasmatico (10x, in alto; 40x, in basso).

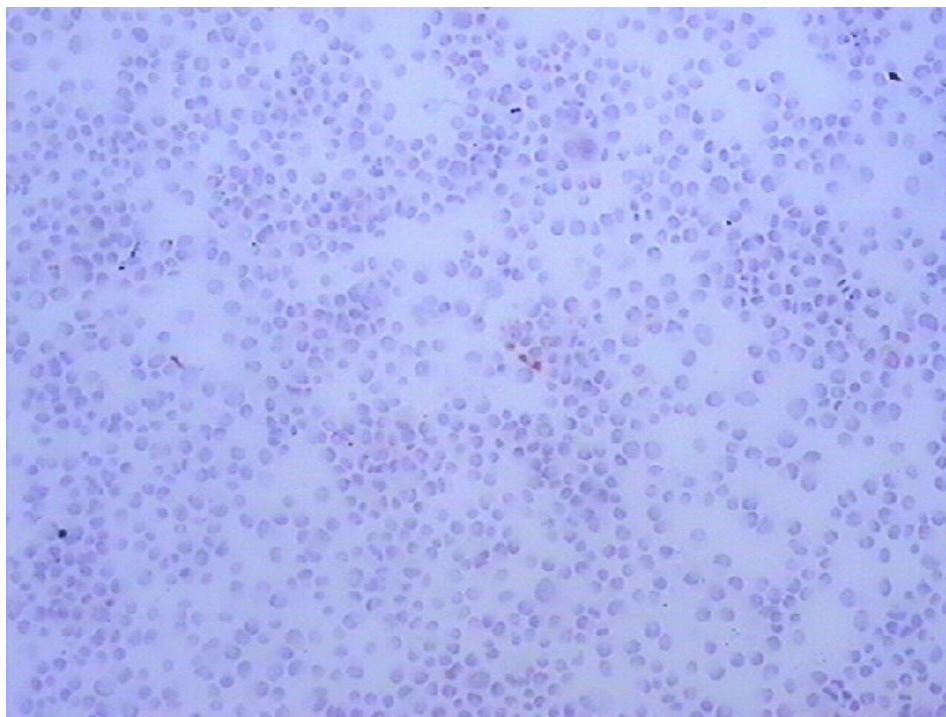


Figura S5: Immunocitochimica delle cellule DH82 effettuata con anticorpo anti-CD45RA di cane; si noti la assenza pressochè totale di positività (10x, in alto); a forte ingrandimento (40x, in basso) solo qualche cellula è risultata positiva.

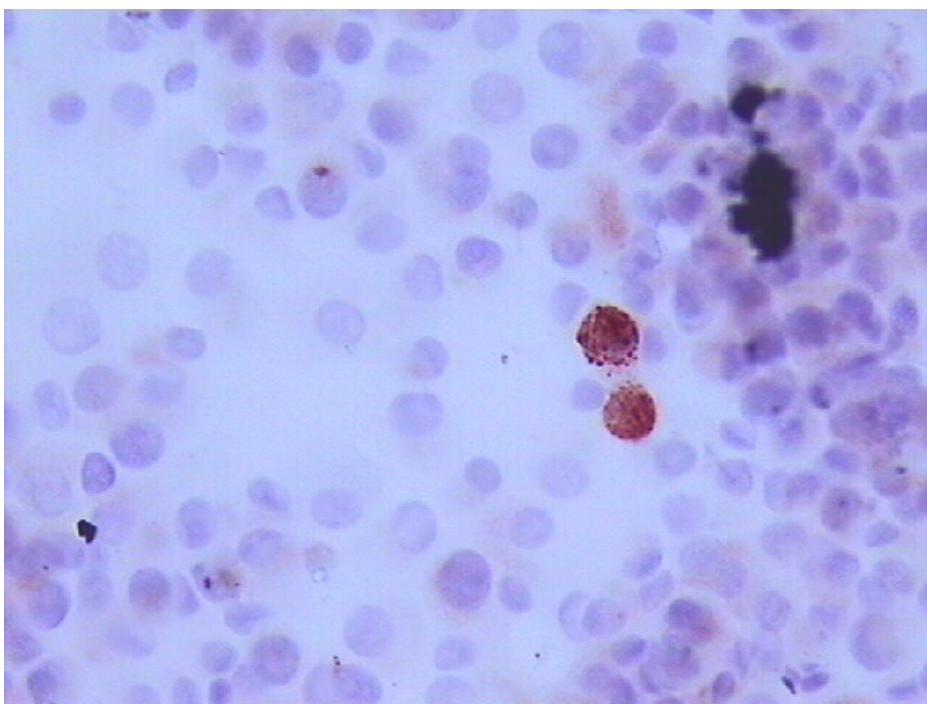
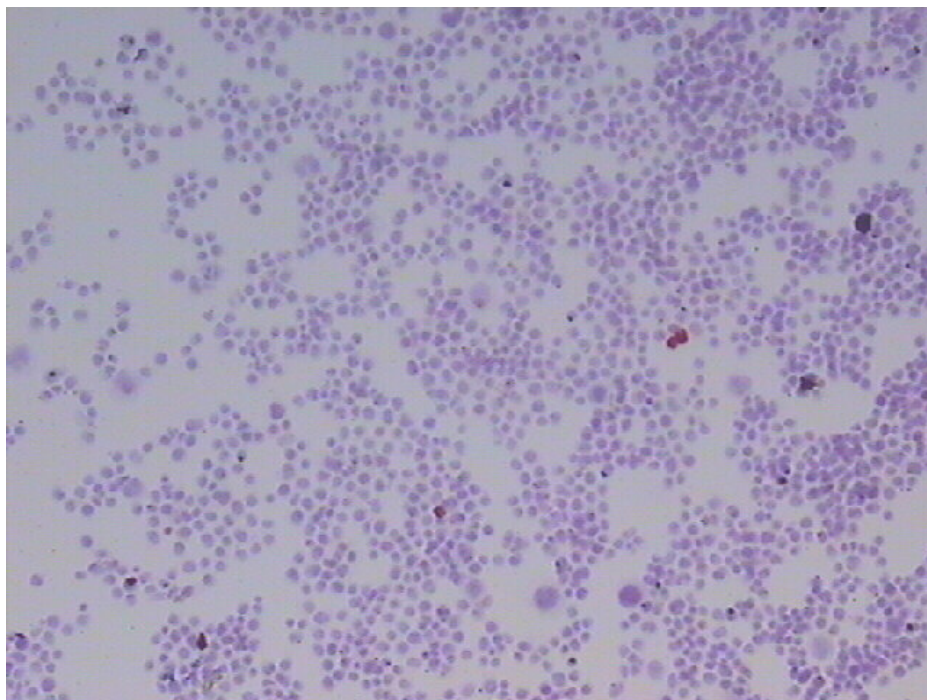


Figura S6: Immunocitochimica delle cellule DH82 effettuata con anticorpo anti-MHCII di cane; si noti la assenza pressochè totale di positività (10x, in alto); a forte ingrandimento (40x, in basso) solo qualche cellula è risultata positiva a livello di granuli citoplasmatici di superficie.

Citofluorimetria – I risultati delle marcature descritte nella parte materiali e metodi sono riportati nella tabella S1, espressi in valori percentuali. In questa fase sono stati eliminati gli anticorpi per quei marker di superficie che avevano dato scarsi risultati in immunocitochimica e, vista la necessità di approfondire la possibilità di queste cellule di esprimere MHCII, sono stati inclusi altri due cloni di anticorpi anti-MHCII (vedi materiali e metodi). Per poter confermare a livello citofluorimetrico la natura monocito-macrofagica della linea, nell'analisi citofluorimetrica è stato incluso un anticorpo anti CD14, che è risultato essere l'unico a dare soddisfacente percentuale di positività.

Anticorpo	% positività delle DH82
CD1c	7,72
CD18	5,52
CD45	11,6
MHCII (CA2.1C12)	0,32
MHCII (TH81A5)	0,63
MHCII (TH14B)	7,33
CD14	97,2

Tabella S1. Percentuale di positività delle cellule ai diversi anticorpi selezionati per l'analisi in citofluorimetria.

5.1.2 – Infezione delle cellule DH82 con *N. caninum* e osservazione delle alterazioni morfologiche e di espressione di markers immunologici.

Neospora caninum è un protozoo del Phylum Apicomplexa agente di aborto nelle bovine e di una grave patologia neuromuscolare del cane (Dubey J.P, 2003). L'immunità nei confronti di *N. caninum* è stata ampiamente indagata nei bovini con esperimenti in vivo ed in vitro (vedi capitolo 3). Al contrario, la risposta immunitaria dell'organismo canino nei confronti dello stesso patogeno non è stata ancora studiata approfonditamente. Questa fase della ricerca era finalizzata all'osservazione delle conseguenze del contatto tra *N. caninum* e le cellule DH82, in termini di infezione e di alterazione di alcuni markers cellulari di superficie, quali CD18, MHCI and MHCII.

MATERIALI E METODI

Culture cellulari DH82 – vedi parte 5.1.1 (Valutazione dell'espressione di markers immunologici della linea cellulare DH82).

Coltivazione dei tachizoiti di Neospora caninum – I tachizoiti di *N. caninum*, essendo organismi intracellulari, richiedono un substrato cellulare per la loro propagazione. Vista inoltre la natura litica del ciclo di replicazione del parassita (che pertanto tende a distruggere il suo substrato), al fine di coltivare i tachizoiti di *N. caninum* è stato necessario propagare, contemporaneamente al monostrato di cellule Vero infette dai parassiti, un monostrato di cellule Vero non infette. Rispetto alle cellule DH82, la principale differenza culturale è che nella coltivazione delle cellule Vero è stato impiegato del terreno RPMI 1640 (Cambrex Bio Sciences, Italia), anziché l'EMEM con aminoacidi non essenziali. Le cellule Vero, infette e non infette, sono state coltivate in flask da 75 (volume impiegato: 18ml RPMI + 2ml FBS) e 175 (volume impiegato: 54ml RPMI + 6ml FBS) cm²; le flask più grosse sono state impiegate in particolare per la produzione di grossi quantitativi di tachizoiti, necessari per procedere all'infezione delle DC. Il terreno impiegato per tali colture è stato il terreno RPMI 1640 completo (cioè

supplementato con L-glutammina, antibiotico e antimicotico) e supplementato di siero bovino al 10%. Per facilitare o accelerare la crescita dei parassiti il tasso percentuale di siero impiegato nelle flask infette è stato abbassato anche fino al 3%. Quando al microscopio rovesciato era visibile nella flask infetta la presenza di numerose pseudocisti contenenti tachizoiti (solitamente ogni 3-4 giorni), si è proceduto allo splitting contemporaneo della coltura infetta e del monostrato non infetto. A tal fine, dopo la rimozione del terreno di coltura in ciascuna flask è stato effettuato un lavaggio con 5ml di tripsina (Gibco BRL-Invitrogen, Italia), la quale è stata poi trasferita in una provetta tipo Falcon da 50ml (per raccogliere le cellule e i tachizoiti eventualmente rimossi durante il lavaggio). Ovviamente, è stata impiegata una provetta per raccogliere il materiale ottenuto dalla flask infetta e una per quello derivante dal monostrato non infetto). In seguito si è proceduto all'incubazione vera e propria di ciascuna flask con 5ml di tripsina, effettuata per 5 minuti nel termostato a 37°C. In seguito al distacco del monostrato (infetto e non infetto), la sospensione così ottenuta è stata trasferita nella rispettiva provetta tipo Falcon usata in precedenza per raccogliere la tripsina di lavaggio, e tali provette sono state poi centrifugate a 1500RPM (400g) per 10 minuti a +4°C. Durante la centrifugazione si è provveduto alla preparazione di nuove flask e di nuovo terreno di coltura sia per accogliere le cellule Vero non infette che per poter continuare la coltura di *N. caninum*; dopo la centrifugazione il sovranatante è stato rimosso e si è proceduto alla risospensione del pellet in terreno di coltura completo. Ad esempio, il pellet delle cellule Vero non infette è stato risospeso in 4ml di terreno completo per poter creare 4 flask di cellule Vero (in ognuna delle quali è stato trasferito 1ml di questa sospensione); il pellet proveniente dalla coltura infetta è stato anch'esso risospeso in 4ml di terreno di coltura completo e una parte di questa sospensione (in quantità direttamente proporzionale all'intensità di infezione che si voleva ottenere) è stata aggiunta ad alcune delle flask preparate con la sospensione di cellule Vero non infette. Le flask così preparate sono state poi incubate in termostato a 37°C 5%CO₂ e controllate per lo sviluppo del parassita fino allo splitting successivo.

Purificazione dei tachizoiti di N. caninum dal substrato cellulare – Per poter procedere all'infezione di un substrato cellulare diverso dalle cellule Vero è stato necessario liberare i parassiti dalle cellule ospite e purificarli dai detriti derivanti da queste ultime.

Per poter purificare i parassiti, sono state prelevate dal termostato una o più flask la cui crescita del parassita era stata ritenuta idonea (elevato numero di pseudocisti e di cellule infette) e si è proceduto alla rimozione del terreno di coltura in ciascuna flask, all'effettuazione di un lavaggio con 5ml di tripsina, la quale è stata poi trasferita in una provetta tipo Falcon (per raccogliere i tachizoiti eventualmente rimossi durante il lavaggio). In seguito si è proceduto all'incubazione vera e propria di ciascuna flask con 5ml di tripsina, effettuata per 5 minuti nel termostato a 37°C. In seguito al distacco del monostrato infetto la sospensione così ottenuta è stata trasferita nella provetta tipo Falcon da 50ml usata in precedenza per raccogliere la tripsina di lavaggio; per raccogliere tutto il materiale disponibile è stato poi effettuato un ulteriore lavaggio della flask con 10ml di terreno di coltura completo, trasferito poi a sua volta nella medesima provetta, la quale è stata poi centrifugata a 1500RPM (400g) per 10 minuti a +4°C. È importante sottolineare che tutti i passaggi da questo punto in poi sono stati effettuati in ghiaccio e con reagenti conservati a +4°C, poiché è stato osservato che un aumento della temperatura anche di breve durata riduce di molto l'infettività dei tachizoiti (mentre ciò non avviene in *T. gondii*). Il pellet così ottenuto è stato risospeso in medium completo e centrifugato poi nuovamente a 1500RPM per 10 minuti a +4°C. Dopo questo passaggio il pellet è stato risospeso in 2ml di terreno ed è stato sottoposto a disaggregazione attraverso ripetuti passaggi attraverso un ago da 25G montato su una siringa da insulina (almeno 20-25 passaggi, seguiti da un controllo sotto il microscopio del grado di rottura delle Vero e del numero approssimativo di tachizoiti liberi). A questo punto la sospensione di tachizoiti è stata conservata in ghiaccio e si è proceduto ad equilibrare una colonna di resina Sephadex G-25 (GE Healthcare, Italia) con del terreno di coltura completo (si è riempita per tre volte la colonna, finché non era interamente colorata di rosa e tutto il liquido di preservazione era stato rimosso), evitando accuratamente che la colonna stessa restasse completamente priva di liquido. Per purificare i tachizoiti provenienti da una o due flask da 75cm² è stata sufficiente una colonna, per purificare i tachizoiti provenienti da una flask da 175cm² è stato necessario impiegare 2 o 3 colonne. A questo punto è stata caricata su ciascuna colonna la sospensione di parassiti previamente preparata, in modo da purificarli dai detriti cellulari (che restano aderenti alle particelle di resina), ed è stato aggiunto di seguito del terreno di coltura completo; il liquido effluente è stato raccolto in una provetta tipo

Falcon da 50 ml. A un certo punto dopo aver caricato la colonna tale liquido effluente si è intorbidito (inizio del passaggio dei parassiti) per poi tornare ad essere limpido (fine del passaggio dei parassiti). A questo punto, dopo aver caricato almeno tre volte la colonna con terreno di coltura per essere certi di aver raccolto il maggior numero di parassiti possibile, la provetta con il liquido effluente contenente i parassiti è stata sottoposta a centrifugazione (in caso di impiego di più di una colonna, le provette di raccolta sono state unificate per quanto possibile) a 1500 RPM per 10 minuti a 4°C. In seguito alla rimozione del sovrantante il pellet è stato risospeso in 1ml di terreno di coltura e i parassiti sono stati contati in un emocitometro di Bürker.

Infezione delle cellule DH82 con N. caninum – 100000 cellule DH82/ml sono state incubate fino alla confluenza ed in seguito infettate con tachizoiti di isolato di *N. caninum* NC-1 (gentile dono di JP Dubey) con un rapporto parassita:cellula di 3:1. In un secondo esperimento le cellule sono state infettate per contatto in sospensione utilizzando lo stesso rapporto parassita:cellula. Le cellule confluenti sono state staccate dalla flask utilizzando una soluzione non enzimatica (Cell Dissociation Solution, Sigma-Aldrich, Italia) in due momenti diversi, a 24 e a 72 ore dall'infezione per essere analizzate tramite citometria a flusso.

Immunocitochimica – Alcune delle cellule DH82 sono state inoltre seminate in chamber slides (Nunc, Denmark) ed una volta raggiunta la confluenza sono state infettate ancora con *N. caninum* NC-1 al rapporto parassita: cellula descritto precedentemente. 24 ore più tardi è stata valutata l'espressione di CD 18 e MHC II mediante reazione di ABC-HRP (LSAB2®/AEC+®, DakoCytomation, Italy) – con protocollo analogo a quello descritto nella parte 5.1.1 – con anticorpi monoclonali anti-CD18 (Clone CA1.4E9, IgG1, Serotec, diluizione 1:10) e anti-MHC II di cane (CA2.1C12, IgG1, Serotec; diluizione 1:10) per determinare l'espressione e l'eventuale alterazione dell'espressione dei markers di superficie mediante microscopia ottica.

Citofluorimetria – Per procedere all'analisi della percentuale di infezione sono state analizzate le cellule DH82 infette e non infette in aliquote da 5×10^5 cellule per ciascuna marcatura da effettuare. I campioni sono stati incubati, analogamente a quanto descritto

nel paragrafo sulle marcature singole, per dieci minuti con anticorpo policlonale anti-*N. caninum* coniugato FITC (VMRD, USA, usato puro) ed analizzati tramite citometria a flusso dopo essere state sottoposte o meno ad una permeabilizzazione preventiva della membrana cellulare con i reagenti del kit Fix&Perm (Caltag).

In caso di permeabilizzazione, sono state seguite le istruzioni del prodotto (il primo reagente – Fixation medium – è stato aggiunto direttamente dopo l'incubazione con l'anticorpo coniugato per un'altra incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente; poi è stato effettuato un lavaggio in PBS e il reagente B – Permeabilization medium – è stato aggiunto alle cellule e lasciato ad incubare per 20 minuti a temperatura ambiente. A questo punto le cellule erano pronte, dopo un ultimo lavaggio, per la lettura al citofluorimetro).

Inoltre, per analizzare le alterazioni dell'espressione dei markers in seguito all'infezione, in seguito al distacco con il reagente non enzimatico Cell Dissociation Solution (Sigma Aldrich, Italia), le cellule infette e non infette sono state analizzate mediante citometria a flusso per determinare l'espressione di MHC I (Clone H58A, VMRD) e di MHC II (Cloni CA2.1C12, Serotec, UK e CAT82A, VMRD) a due diversi intervalli di tempo (24 e 72 ore post infezione). Entrambi gli anticorpi sono stati utilizzati ad una diluizione di 1:10 in un protocollo analogo a quello riportato nella parte 5.1.1; l'unica differenza è stato l'impiego di un anticorpo secondario coniugato R-PE (Goat Anti-Mouse IgG (γ), Caltag, USA). Anche in questo caso i risultati sono stati espressi in termini di percentuale di cellule positive a partire dal confronto tra il valore rilevato nelle cellule non marcate (valore background) e quello rilevato nelle cellule marcate con un anticorpo.

RISULTATI

Infezione delle cellule DH82 – Già 72 ore dopo l'infezione è stato osservato un calo della densità cellulare e un cambiamento di forma, verso una tipologia fusiforme (vedi Figura S7A). Dopo lo stesso intervallo di tempo è stato possibile osservare delle pseudocisti contenenti tachizoiti di *N. caninum* (vedi Figura S7B). L'intensità dell'infezione osservata non era fortissima (le pseudocisti osservate non erano molto frequenti nel monostrato) però già dopo una settimana di infezione le cellule non sono

state in grado di opporsi all'effetto litico di *N. caninum* e il monostrato è stato completamente distrutto. Non è stata osservata alcuna differenza tra l'infezione del monostrato e l'infezione delle cellule in sospensione.

Immunocitochimica – Per quanto riguarda l'immunocitochimica, la marcatura per MHCII ha dato esito negativo sia nelle cellule infette che non infette, in un quadro simile alla Figura S6 della parte A. Nel caso del CD18, invece, si è notato come le cellule infette siano andate incontro a una downregulation di tale recettore di superficie 24 ore dopo l'infezione (vedi Figure S8 e S9).

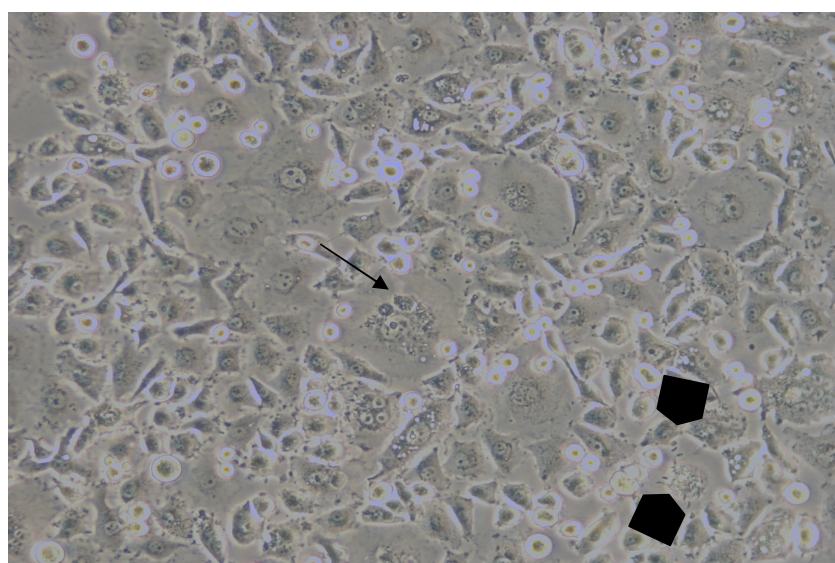
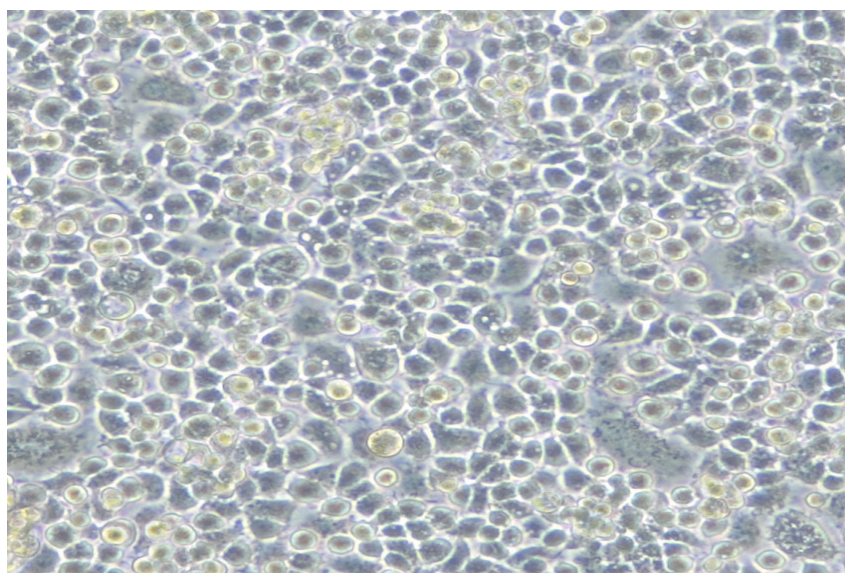


Figura S7A: Cellule DH82 non infette (in alto, 4x) e 72 ore dopo l'infezione con *N. caninum* (in basso, 4x): le cellule non infette presentano una morfologia globosa e sono più dense, quelle infette invece, allo stesso ingrandimento, appaiono fusiformi e meno dense; nell'immagine delle DH82 infette sono evidenziate (freccie) delle pseudocisti contenenti tachizoiti di *N. caninum* e (punte di frecce) dei tachizoiti liberi.

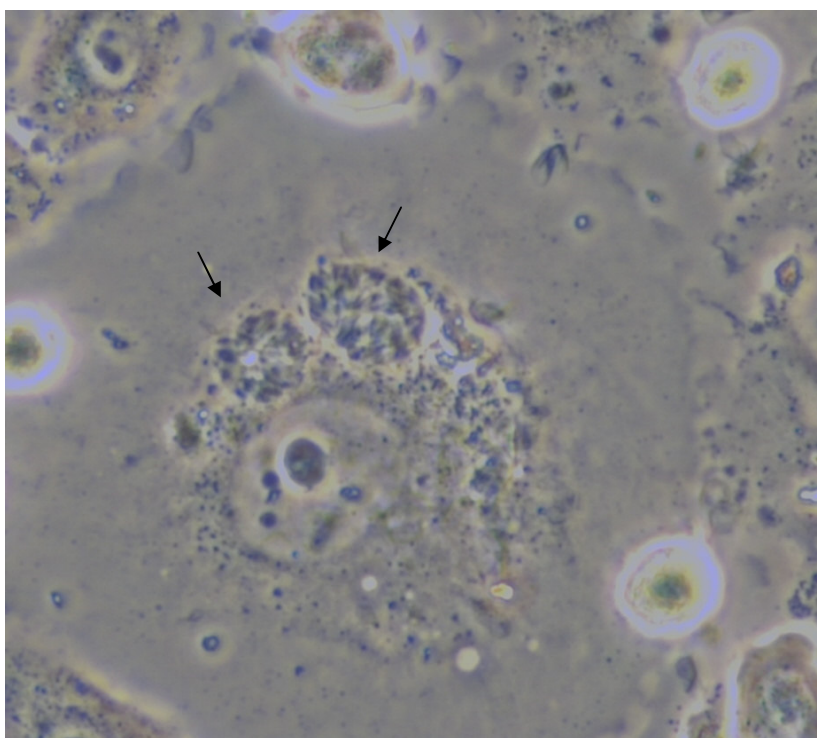
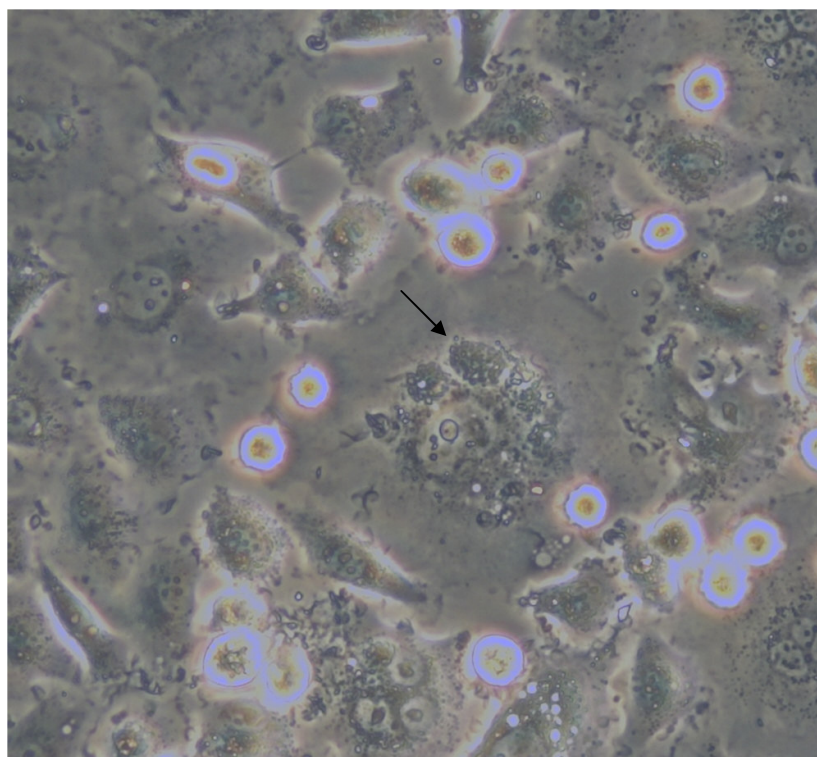


Figura S7B: Cellule DH82 72 ore dopo l'infezione con *N. caninum*: nelle due immagini sono evidenziate (freccie) delle pseudocisti contenenti tachizoiti di *N. caninum* (10x, in alto; 40x, in basso).

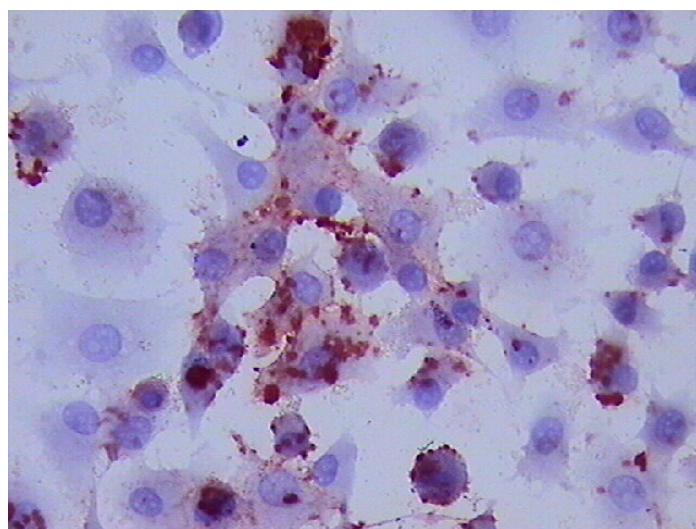
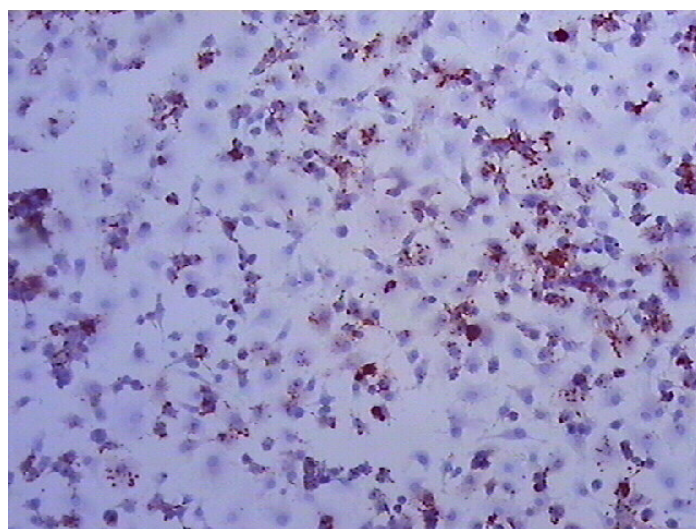


Figura S8. Marcatura anti CD18 di cane su cellule DH82 non infette da *N. caninum*. Si noti l'espressione localizzata a livello citoplasmatico del recettore, diffusa a numerose cellule (10x, in alto; 40x, in basso).

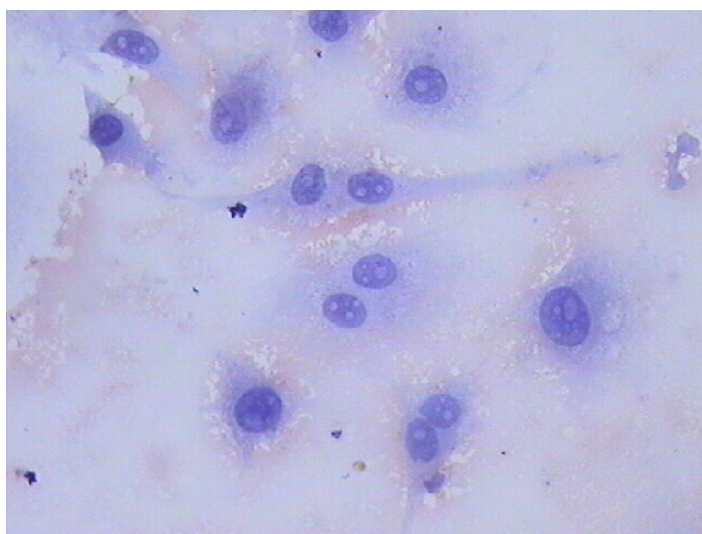
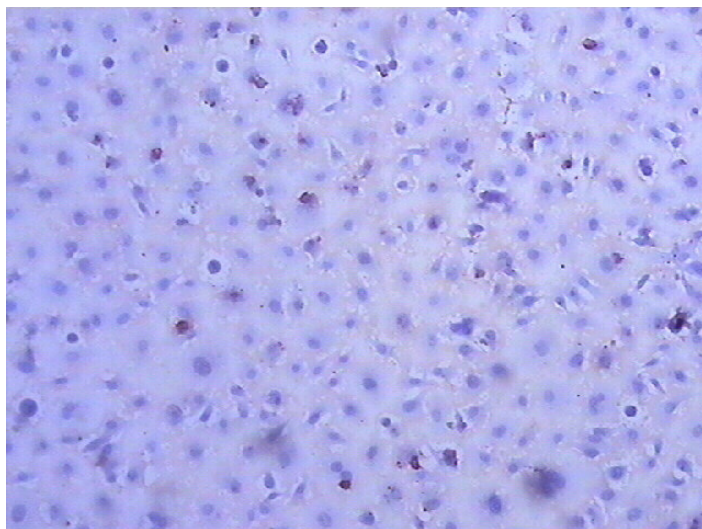


Figura S9. Marcatura anti CD18 di cane su cellule DH82 24 ore dopo l'infezione con *N. caninum*. Si noti il forte calo di positività rispetto alle cellule non infette (10x, in alto; 40x, in basso).

Citofluorimetria – I dati dell’analisi in citofluorimetria sono riportati nella Tabella S2 e nella Figura S10

	24 ore post infezione	72 ore post infezione
ANTI- <i>N. caninum</i>		
DH82	5,24	2
DH82-NC1	30	12
DH82-NC1 in sospensione	N/A	60
ANTI-MHC II (CAT82A)		
DH82	8,45	12,6
DH82-NC1	26	5,2
ANTI-MHC I (H58A)		
DH82	90,4	98,9
DH82-NC1	80,2	99,3

Tabella S2. Analisi citofluorimetrica delle cellule DH82 infette con *N. caninum*; i valori esprimono la percentuale di positività delle diverse condizioni delle diverse marcature. DH82: non infette; DH82-NC1: infette

Figura S10. Rappresentazione grafica dell’analisi in citofluorimetria con anticorpo anti-*N. caninum* coniugato FITC

S10A: DH82 non infette (24 ore post infezione, p.i.)

S10B: DH-82 infette con *N. caninum* 24 ore p.i.

S10C: DH-82 infette con *N. caninum* 72 ore p.i.

S10D: DH-82 infette con *N. caninum* 72 ore p.i. e raccolte direttamente in sospensione

Figura S11. Rappresentazione grafica dell’analisi in citofluorimetria con anticorpo anti-MHCII coniugato RPE

S11A: DH82 non infette (24 ore p.i.)

S11B: DH-82 infette con *N. caninum* 24 ore p.i.

S11C: DH-82 infette con *N. caninum* 72 ore p.i.

Figure S12. Rappresentazione grafica dell’analisi in citofluorimetria con anticorpo anti-MHCI coniugato RPE

S12A: DH82 non infette (24 ore p.i.)

S12B: DH-82 infette con *N. caninum* 24 ore p.i.

S12C: DH-82 infette con *N. caninum* 72 ore p.i.

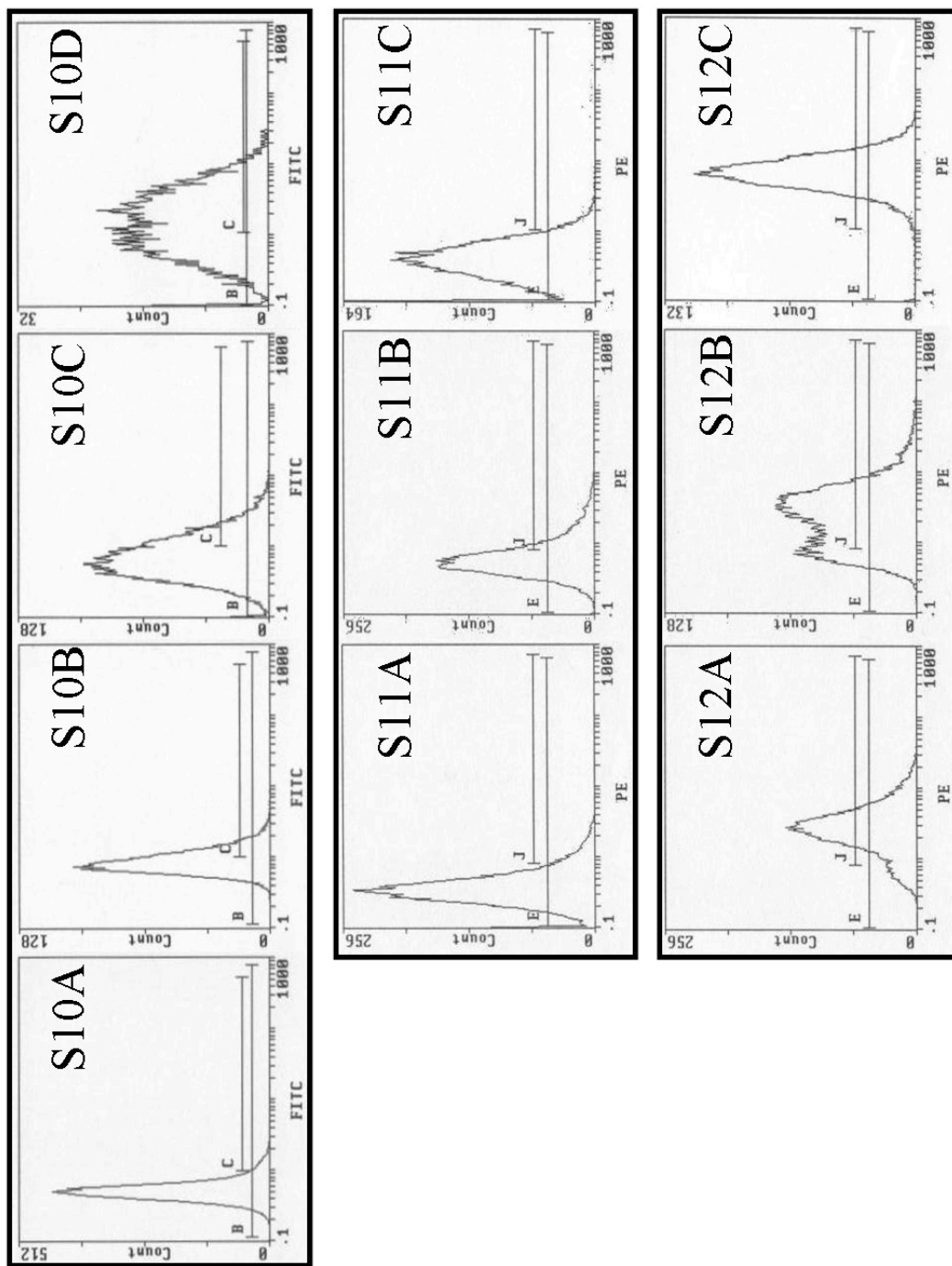


Figure S10, S11, S12 (didascalia pagina precedente)

DISCUSSIONE

La caratterizzazione della linea cellulare DH82 mediante immunocitochimica ha permesso di dimostrare come queste cellule almeno in parte hanno un'origine o delle caratteristiche dendritiche, grazie all'espressione del recettore di superficie CD1c (ma non di CD1a), caratteristico delle DC (in particolare delle cellule di Langherans). Secondo le conoscenze più recenti, tale recettore svolge la funzione di presentazione di antigeni non proteici (lipidici e glicolipidici ai linfociti T) (Abbas A. K. et al., 2003). CD18 è una subunità delle integrine $\beta 2$, coinvolte nell'adesione dei leucociti all'endotelio nelle fasi che precedono la loro uscita al di fuori del letto vascolare. L'espressione costitutiva di questo marker, così come la sua successiva downregulation che segue l'infezione stanno a testimoniare che *N. caninum* è in grado di attivare nelle cellule DH82 un meccanismo che causa una loro perdita di aderenza. La marcatura con anti-CD 18 non è stata effettuata in citometria a flusso, a causa del basso livello di positività registrato sia nelle cellule infette che in quelle non infette; comunque, anche per altri anticorpi (soprattutto anti-CD1c), non c'è stata corrispondenza tra quanto osservato in citochimica e quanto osservato in citometria. Alcuni marker, come CD45 e CD14, sono risultati essere ben espressi rispettivamente in immunocitochimica e in citofluorimetria, a conferma della natura leucocitaria e monocitaria della linea cellulare DH82.

Nella presente ricerca è stata riportata per la prima volta la recettività della linea DH82 all'infezione da *N. caninum*. L'infezione delle cellule è stata osservata mediante microscopia rovesciata, e sebbene da principio non molto intensa, ha comunque portato alla lisi completa del monostrato in una settimana di tempo. L'infezione è stata caratterizzata inoltre da un cambiamento nella morfologia cellulare: una volta infette, le cellule hanno perso la loro forma originale globosa e sono diventate stellate e fusiformi, mentre contemporaneamente la densità cellulare si è abbassata a causa della perdita di aderenza; è stato qui dimostrato come tale fenomeno sia mediato sicuramente anche dalla downregulation di CD18 che l'infezione causa nelle DH82. La perdita di aderenza in una linea cellulare di origine dendritico-istiocitaria, sebbene si tratti di una linea di origine neoplastica, potrebbe in qualche modo essere un residuo del

comportamento delle DC immature tissutali, che una volta incontrato l'antigene (e forse infette) lasciano il loro sito di residenza per raggiungere l'area T dei linfonodi. Proprio per questo, si è tentato di comprendere approfonditamente il tasso di espressione di MHCII in queste cellule, prima e dopo l'infezione.

I risultati della citometria a flusso ottenuta nei due diversi momenti hanno evidenziato che il tasso di infezione (stimato in base alla positività delle cellule marcate con anticorpo anti-*N. caninum*) da *N. caninum* nelle cellule aderenti 24 ore post infezione era del 30% e diminuiva al 12% 72 ore post infezione. La percentuale di infezione è invece salita al 60% quando sono state esaminate le cellule in sospensione, quelle cioè che avevano perso aderenza. La citofluorimetria con anticorpi Anti-NC effettuata su cellule non permeabilizzate ha sempre dato un risultato di positività corrispondente al valore basale (ovvero, il valore registrato sulle cellule non infette), confermando in questo modo la velocità e l'efficacia della penetrazione e/o la probabile distruzione mediante fagocitosi dei tachizoiti incapaci di penetrare.

La valutazione immunocitochimica e citofluorimetrica per ottenere una valutazione preliminare degli effetti dell'infezione sull'espressione dei markers cellulari di superficie ha preso in considerazione i markers CD18, MHCII e MHCI (quest'ultimo solo in citometria). Si è già accennato alla marcata diminuzione dell'espressione di CD18 a 24 ore dall'infezione in immunocitochimica, mentre per quanto riguarda i recettori MHC, l'unica marcatura effettuata in citochimica (quella con MHCII) non ha permesso di evidenziare alcuna positività, nè in cellule non infette che in DH82 infette. È stata osservata a 24 ore p.i. una iniziale up-regulation dell'espressione di MHCII di superficie, seguita da un calo significativo nelle 48 ore successive. È risaputo che molti patogeni intracellulari hanno la capacità di causare una down-regulation nell'espressione dell'MHCII di superficie per evitare il riconoscimento da parte del sistema immunitario. È probabile che *N. caninum* si comporti in un modo analogo. Infine, è stata studiata l'espressione di MHCI: recentemente vi è stato forte interesse riguardo al ruolo della presentazione antigenica MHCI-dipendente durante l'infezione da parte di organismi intracellulari quali *T. gondii* (Lüder C.G. et al, 2001) ed è stato suggerito che l'attivazione antigene-specifica delle cellule T CD8+ sia necessaria non solo per permettere la lisi delle cellule infette, ma anche come fonte costante di IFN γ . Nel presente esperimento, l'infezione con *N. caninum* ha causato una diminuzione

iniziale dell'espressione di MHCI che è stata seguita da un ritorno a valori normali 72 ore p.i. Si potrebbe pensare che *N. caninum* sia in grado dapprima di inibire l'espressione di MHC I, riuscendo così a ridurre e potenzialmente precludere la produzione di IFN γ , ed in seguito inibendo la presentazione antigenica MHCII-dipendente.

Questi esperimenti dimostrano nel loro complesso che la linea cellulare DH82 è recettiva all'infezione da *N. caninum* e potrebbe diventare un utile modello in vitro per la valutazione della risposta immunitaria all'infezione da parte di cani ammalati. È stato recentemente dimostrato che la linea cellulare DH82 di origine istiocitica/dendritica consente l'infezione di diversi patogeni intracellulari come *Ehrlichia canis* (Harrus S. et al, 2003) e *Leishmania infantum* (Maia C. et al, 2007). La caratterizzazione di questa linea ha dimostrato che essa conserva importanti funzioni immunitarie. Come già accennato, l'aumento della percentuale di cellule infette a 72 ore post infezione nelle cellule DH82 andate incontro a perdita di aderenza ricorda ciò che accade durante l'infezione in vitro di cellule dendritiche da parte del parassita *Toxoplasma gondii*, strettamente correlato con *N. caninum* (Lambert H. et al, 2006). Tale fenomeno è inoltre indice di attivazione della presentazione antigenica. Nell'inseme, la conferma mediante marcatura anti-CD1c della natura dendritica di questa linea cellulare e i primi risultati riguardo l'infezione con *N. caninum* fanno ritenere necessaria l'effettuazione di ulteriori studi per valutare la validità di tale modello in-vitro per lo studio della risposta immunitaria del cane nei confronti di *N. caninum*.

5.2 – Generazione e infezione di cellule dendritiche del bovino con *Neospora caninum* e di cane con *Leishmania infantum*.

5.2.1 – Generazione di DC bovine mediante l'impiego del TCCM e loro infezione con *Neospora caninum*.

Come si è visto nel capitolo 3, l'infezione persistente da *N. caninum* è in grado di indurre una qualche forma di immunità, probabilmente nei confronti di un'infezione successiva e forse anche nei confronti della riattivazione di un'infezione cronica (Dubey J.P. et al, 2006); comunque si è ancora lontani dalla comprensione della natura di una risposta protettiva. L'immunità nei confronti di *N. caninum* è stata studiata in vitro in numerosi tipologie cellulari, tra cui le cellule endoteliali e le cellule natural killer (Boysen P. et al., 2006). Si è ipotizzato che le risposte immunitarie acquisite sia di tipo umorale che di tipo cellulo-mediato siano necessarie per controllare la proliferazione di *N. caninum*. D'altro canto, non è ancora stato studiato il ruolo della risposta immunitaria innata. Le cellule dendritiche (dendritic cells, DC), essendo cellule specializzate nei processi di uptake, processazione e presentazione dell'antigene sia ai linfociti T naive che ai linfociti T memoria, sono responsabili del riconoscimento antigene-specifico nei confronti di molti agenti patogeni; in sintesi sono in grado di dare inizio alla risposta immunitaria acquisita (Steinman R.M. et al., 2006). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che le DC infette con *T. gondii* sono in grado di produrre interleuchina 12 (IL-12), stimolando anche una forte risposta innata (Liu C.H. et al., 2006). Esistono in letteratura diversi studi di generazione in vitro delle DC a partire da precursori presenti nel sangue periferico incubati con citochine ricombinanti in grado di portare gli stessi a una differenziazione più o meno completa (O'Doherty U. et al., 1997; Paillot R. et al., 2001; Bienzle D. et al., 2003); tutte queste metodiche sono perlopiù basate sull'impiego di IL-4 e di GM-CSF. Più recentemente, per le specie animali ove tali citochine ricombinanti non sono facilmente disponibili, è stato messo a punto un metodo di generazione delle DC, basato su un medium condizionato dai linfociti T (Wijewardana V. et al., 2006). Mentre sono evidenti i vantaggi di tale

metodologia (assenza di impiego di citochine ricombinanti), non è ancora ben definito quale sia lo stadio di maturazione delle DC ottenuto con l'impiego del TCCM: con le citochine ricombinanti solitamente si sono ottenute cellule dendritiche immature, mentre è noto che l'area T dei linfonodi porta le DC a completa maturazione. Lo scopo dei presenti esperimenti è stato di generare DC in vitro dal sangue periferico di bovino e di stabilire se le DC di bovino così generate possono essere recettive all'uptake e alla processazione di *N. caninum*.

MATERIALI E METODI

Preparazione dei PBMC di bovino – Le cellule mononucleate del sangue periferico (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) bovino sono state preparate a partire dal sangue di bovine di razza Holstein Fresian presenti presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Parma. Da ciascun bovino è stato prelevato un quantitativo massimo di 200ml di sangue. Il sangue è stato prelevato in siringhe contenenti una adeguata quantità di EDTA (concentrazione 0,5M, 1ml per 20ml di sangue) in modo che la concentrazione finale dell'anticoagulante fosse pari a 25mM. Il sangue intero è stato aliquotato in condizioni di sterilità in provette tipo Falcon da 15ml, all'interno di ogni provetta sono stati inseriti 13-14ml di sangue. Successivamente, le provette sono state centrifugate a 2500RPM (1258g) per 30 minuti a 18°C in una centrifuga ThermoElectron refrigerata. Dopo la centrifugazione, sempre in condizioni di sterilità, è stato delicatamente rimosso il plasma mediante l'impiego di pipette sterili per sierologia e in seguito è stato prelevato il buffy coat con puntali da 1000µl. I buffy coat provenienti dalle diverse provette sono stati trasferiti in una provetta tipo Falcon da 50ml e poi diluiti con una soluzione PBS-EDTA 2mM conservata a +4°C (il mantenimento di questa temperatura a partire da questa fase e fino alla centrifugazione su Ficoll garantisce che la densità di quest'ultimo resti costante) in un rapporto 1 : 5 (buffy coat : PBS-EDTA). Successivamente, sono state preparate delle provette tipo Falcon da 15ml aliquotando al loro interno 3ml di Ficoll-Paque Plus endotoxin free (GE Healthcare, Italia) conservato a +4°C; sopra il Ficoll-Paque sono stati poi delicatamente stratificati 10ml di buffy coat diluiti e mantenuti a +4°C, mediante una pipetta per sierologia impiegando la velocità minima di caduta (pari alla forza di gravità). Dopo la

stratificazione, le provette sono state centrifugate (dopo aver rimosso il freno della centrifuga per non disturbare l'anello di mononucleati che si forma in questo momento) a 3200RPM (1800g) per 30 minuti a +4°C. Alla fine del passaggio in centrifuga in ciascuna provetta erano presenti 4 fasi ben distinte: dal basso verso l'alto, erano presenti i globuli rossi e i granulociti, una fase più chiara (il Ficoll) ricca di neutrofili, l'anello di PBMC e la fase più chiara contenente plasma e piastrine. Con una pipetta per sierologia è stata rimossa la fase superiore, e con un puntale da 1000µl sono stati raccolti gli anelli di PBMC da ciascuna provetta. Le PBMC sono state quindi poste in una provetta tipo Falcon da 50ml, e il volume della provetta è stato portato a 50ml con la soluzione PBS-EDTA 2mM conservata a +4°C; in seguito, la provetta è stata centrifugata a 1700RPM (500g) per 7 minuti. Questo passaggio, ripetuto finché il surnatante risulti limpido (almeno tre volte) rappresenta un lavaggio delle PBMC dalle piastrine. Dopo i lavaggi con PBS-EDTA il pellet di PBMC è stato risospeso in 2 ml di Red Blood cells lysing buffer (SIGMA, Italia) ed incubato per 1 minuto a 37°C, per eliminare gli eventuali globuli rossi residui. In seguito, è stato effettuato un ulteriore lavaggio con PBS-EDTA 2mM e si è proceduto alla conta della PBMC con un emocitometro (Bürker).

Preparazione del T-cell conditioned medium (TCCM) – Schema nella figura S13A

Preparazione colonne di Nylon wool (secondo Julius M.H. et al., 1973) – 0.5g di nylon wool sono stati inseriti in siringhe da 10ml private dello stantuffo e con quest'ultimo è stata fatta pressione in modo che il livello della nylon wool fosse a 1,5ml di volume. In seguito, le siringhe (senza stantuffo) sono state inserite in involucri per autoclave, sigillate e sterilizzate a 110°C per 10 minuti in autoclave. Ciascuna colonna così preparata poteva separare i linfociti T a partire da un massimo di 1.5×10^8 PBMC (in un volume di 2ml, con un volume di raccolta di 15ml).

Separazione dei linfociti T su colonne di nylon wool (secondo Julius M.H. et al., 1973)

– Prima di iniziare è stato scaldato del terreno di coltura RPMI (Cambrex BioSciences, Italia) supplementato al 5% con siero fetale bovino (RPMI-5) per poterlo impiegare nei diversi passaggi della separazione delle cellule T. A ciascuna colonna, dopo averla fissata su uno stativo sotto cappa a flusso laminare, è stato applicato un rubinetto sterile per uso medico, in grado di permettere l'interruzione del flusso attraverso la colonna stessa; all'uscita del rubinetto è stato posto un ago da 19G. Ciascuna colonna è stata

equilibrata (aprendo il rubinetto e facendovi passare attraverso il liquido) con 25ml di RPMI-5 riscaldato, avendo cura di rimuovere le eventuali bolle d'aria presenti, sia con piccoli urti alla colonna che con una lieve pressione esercitata con una pipetta per sierologia sterile. Alla fine di questa procedura il rubinetto è stato chiuso e per evitare che la nylon wool si seccasse sono stati aggiunti 2-3ml di RPMI-5 riscaldato, prima di incubare la colonna a 37°C in incubatore umidificato in posizione verticale, tappata, per almeno 45 minuti. Le PBMC sono state risospese in RPMI-5 ad una concentrazione di 7.5×10^7 cellule/ml in un volume totale di 2ml. La colonna è stata prelevata dall'incubatore a 37°C, posta nuovamente sotto la cappa a flusso laminare, è stato fatto defluire il terreno RPMI-5 sovrastante e successivamente sono stati aggiunti i 2ml di sospensione di PBMC, più altri 2ml di RPMI-5 per fare penetrare le PBMC. Il rubinetto è stato ancora chiuso e la colonna ha subito un'ulteriore incubazione in incubatore umidificato a 37°C per 45 minuti. Dopo questo passaggio l'ago da 19G è stato sostituito da un ago più sottile a 23G, la colonna è stata posta sotto cappa a flusso laminare e dopo l'apertura del rubinetto è stata riempita di terreno RPMI-5 per la raccolta dei linfociti T. I primi 15 ml di liquido effluente sono stati infatti raccolti e centrifugati a 1000 giri. Dopo la centrifugazione era osservabile un pellet di cellule T contate con un emocitometro di Bürker.

Preparazione del TCCM (secondo Ibisch C. et al., 2005; Wjevardana V. et al., 2006) –

Per poter produrre il TCCM sono state preparate delle piastre multiwell da 6 pozzetti incubate con anticorpo monoclonale anti-CD3 di bovino (VMRD, USA). In ciascun pozzetto è stato posto 1ml di anticorpo anti-CD3 alla concentrazione 5µg/ml, diluito in PBS sterile e le piastre sono state incubate overnight a +4°C. Dopo tre lavaggi con PBS, in ciascun pozzetto sono stati poi aggiunti da 1×10^6 a 5×10^6 linfociti T ottenuti con la nylon wool, in un volume di 2ml (per ciascuna piastra a 6 pozzetti, il volume totale è di 12ml) di terreno di coltura RPMI 1640 supplementato con antibiotico/antimicotico e con il 10% di siero fetale bovino. In seguito, le piastre così preparate sono state incubate a 37°C con il 5% di CO₂ per 48 ore. Trascorso questo tempo il terreno di coltura dei linfociti è stato aspirato, centrifugato a 2000RPM per 10 minuti a +4°C e congelato a -80°C in aliquote di 0,5ml per il suo successivo utilizzo come TCCM.

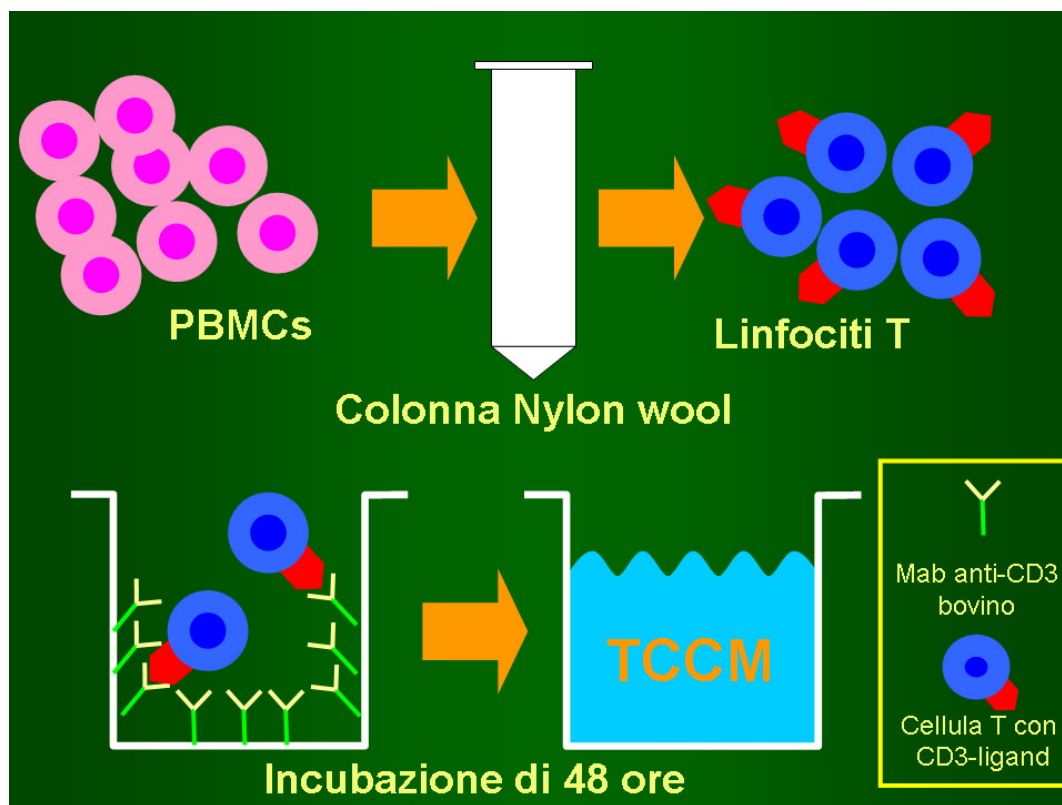


Figura S13A: Preparazione del TCCM

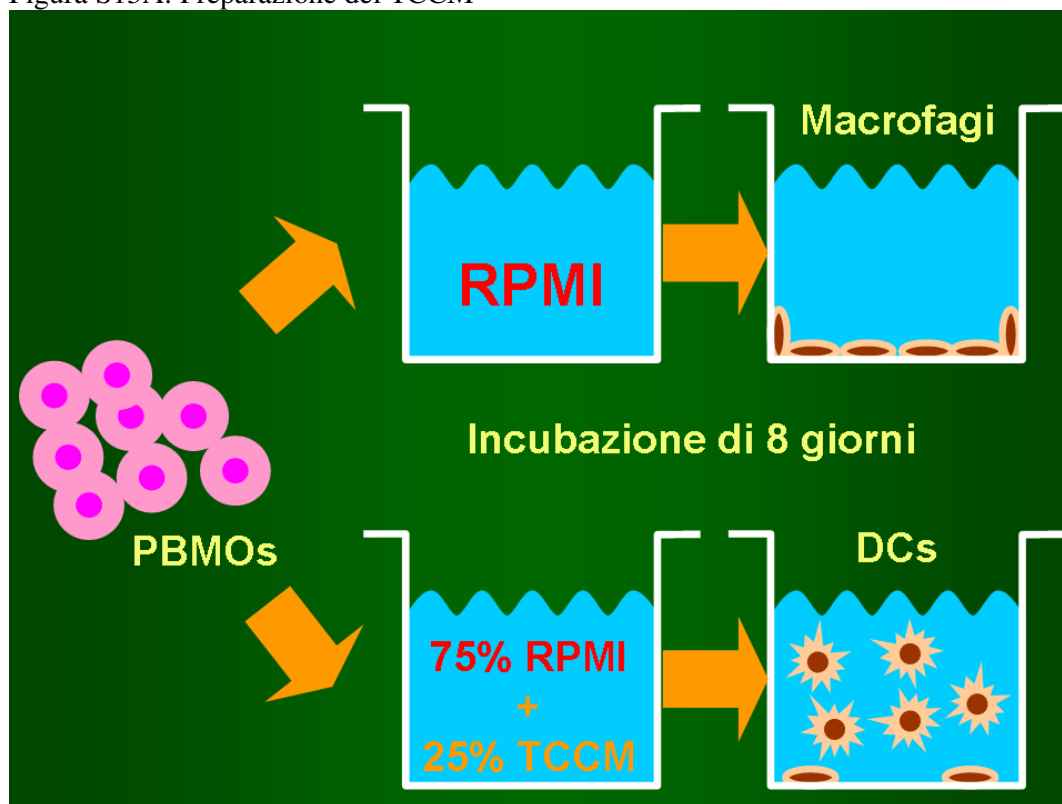


Figura S13B: Generazione di cellule dendritiche con TCCM.

Generazione delle DC bovine con TCCM (schema nella figura S13B) – Le cellule dendritiche di bovino sono state generate a partire da monociti di bovino, preparati per aderenza a partire dalle PBMC ottenute con il protocollo sopra descritto. $2,5 \times 10^6$ PBMC sono state incubate in ciascun pozzetto di una piastra multiwell da 24 pozzetti (con una lieve modifica da Ibisch C. et al., 2005, che impiegavano 12×10^6 PBMC per ciascun pozzetto di piastre multiwell da 6 pozzetti) in un volume di 2ml di RPMI 1640 supplementato con antibiotico e antimicotico e con il 10% di siero fetale bovino. In fondo a ciascun pozzetto di queste piastre era stato posto un vetrino coverslip rotondo previamente sottoposto a coating con polilisina (ciascun vetrino è stato posto in una camera umida per 30 minuti su gocce di 100 μ l di una soluzione di di polilisina (Sigma Aldrich, Italia) alla concentrazione di 0,1 mg/ml, lavato poi in acqua distillata due volte, asciugato e posto sul fondo della piastra, che è stata a sua volta sterilizzata con raggi UV per 30 minuti), per poter studiare le caratteristiche delle cellule aderenti, sia nei controlli negativi che nei pozzetti di generazione delle DC con TCCM. Le piastre sono state incubate a 37°C, 5% CO₂ per 2 ore, per consentire l'adesione dei monociti, dopodiché sono stati effettuati dei lavaggi con PBS per rimuovere le cellule non aderenti. I monociti così selezionati sono stati poi incubati con il TCCM; in ciascun pozzetto destinato alla generazione delle DC sono stati aggiunti 2 ml così composti: 75% di RPMI completo al 10% di siero fetale bovino e il 25% di TCCM preparato con il protocollo sopra descritto. Ogni due giorni il 50% del terreno di coltura è stato sostituito con una miscela analoga a quella originale (75% terreno RPMI completo, 25% TCCM), per una settimana di tempo. Nei pozzetti di controllo i monociti sono stati incubati esclusivamente con terreno di coltura. Essendo noto che l'incubazione dei monociti per una settimana circa porta alla loro differenziazione in macrofagi, tali pozzetti sono serviti sia per il controllo dell'efficacia del TCCM che per avere a disposizione dei macrofagi di bovino su cui testare le conseguenze dell'infezione con *N. caninum* in maniera analoga alle DC (valutazione dell'infezione, analisi dell'espressione dell'MHCII in citochimica).

Coltivazione e purificazione dei tachizoiti di N. caninum per procedere all'infezione delle DC – Contemporaneamente, sono stati coltivati in vitro i tachizoiti di *N. caninum*

e successivamente sono stati purificati per poter procedere all'infezione. Per i dettagli, vedi parte 5.1.2.

Infezione delle cellule DC e dei macrofagi con N. caninum – Per procedere all'infezione sono stati inoculati $1,75 \times 10^6$ tachizoiti in ogni pozzetto di generazione delle cellule DC con TCCM in base alla stima delle cellule presenti ($0,75 \times 10^6$ macrofagi nei pozzetti di controllo e $0,22 \times 10^6$ DC nei pozzetti sottoposti a incubazione con il TCCM. 24 ore p.i. sui macrofagi è stata condotta una immunocitochimica con anticorpi anti-*N. caninum* e anti-MHCII con le medesime modalità di quanto descritto di seguito per le DC.

Citocentrifugazione delle cellule, colorazione May Grünwald Giemsa modificata e immunocitochimica – Nel corso della generazione delle DC (ogni due giorni, al momento della sostituzione del terreno di coltura), così come alla fine della loro generazione e/o 24 ore post-infezione, le cellule in sospensione (cioè le DC vere e proprie) sono state citocentrifugate su vetrini polilisinati (Bio Optica, Italia) mediante Cytokit della ditta ThermoElectron. I blocchi per la citocentrifugazione sono stati centrifugati a 600 RPM (60g) per 10 minuti +4°C. In seguito alla centrifugazione, i vetrini sono stati staccati dai blocchi, lavati in PBS e fissati per 10 minuti in etanolo puro a -20°C e lasciati asciugare a temperatura ambiente.

In caso di colorazione MGG modificata, è stato impiegato il kit Diff-Quick della ditta Bio Optica (Italia) che prevede passaggi rapidi (10 secondi ciascuno) nei coloranti B e C, intervallati da un lavaggio in acqua di fonte. Il protocollo originale prevederebbe una prima fissazione con il reagente A, ma i vetrini impiegati erano già stati sottoposti a fissazione.

In aggiunta alla colorazione May-Grunwald-Giemsa modificata per la caratterizzazione morfologica, a 24 ore dall'infezione le DC generate con TCCM centrifugate su vetrini polilisinati mediante Cytokit (ALC-Thermo Electron) sono state sottoposte all'immunocitochimica impiegando come anticorpi primari un antisiero anti-*Neospora caninum* (VMRD, USA, usato 1:2000) e un anticorpo monoclonale anti-MHCII di bovino (Clone CAT82A, IgG2, VMRD, USA) alla concentrazione di $30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, con protocollo analogo a quello descritto nella parte 5.1.1. In particolare, l'immunocitochimica nei confronti di MHCII è stata effettuata con lo scopo di valutare

la possibile up-regulation di questo recettore, coinvolto nella presentazione antigenica e ritenuto allo stesso tempo un marker classico della maturazione delle cellule dendritiche.

RISULTATI

Generazione di cellule dendritiche bovine e immunocitochimica con anti-MHCII – Come è possibile osservare nelle figure S15A-C, l'incubazione dei monociti con il TCCM al 25% ha causato una progressiva modificazione della morfologia delle cellule in sospensione, verso un aspetto sempre più “dendritico”. Contemporaneamente si è assistito ad un calo della quantità di cellule aderenti sul fondo del pozzetto. Per quanto riguarda l'espressione di MHCII, l'immunocitochimica effettuata all'ottavo giorno di incubazione ha permesso di evidenziare forte positività a livello superficiale e di dendriti, e in parte a livello citoplasmatico (fig S15D-F). In qualche caso (fig. S15E) è stata anche osservata la presenza di lunghi prolungamenti MHCII-positivi a formare un “network” tra più cellule. Tale positività, oltre alla chiara morfologia dendritica, è una probabile conferma della maturità delle DC generate.

Infezione dei macrofagi e immunocitochimica con anti-N. caninum – Allo scadere del termine di generazione delle DCs (una settimana), contemporaneamente all'infezione di queste ultime è stata effettuata l'infezione dei macrofagi derivati dai monociti aderenti al vetrino coverslip presente in fondo al pozzetto (1 settimana di coltivazione in terreno standard senza l'aggiunta di citochine è in grado di causare la differenziazione dei macrofagi in monociti). L'esito dell'infezione (inclusa l'immunocitochimica anti-*N. caninum*) dei macrofagi è presentato nelle figure S14A-F. A piccolo e medio ingrandimento (S14A-D) è possibile osservare come a 24 ore p.i. la morfologia cellulare sia cambiata verso una tipologia più reattiva e fusiforme, analogamente a quanto osservato nell'infezione delle cellule DH82 (parte 5.1.2). A conferma dell'avvenuta infezione è stato possibile osservare la presenza di tachizoiti in replicazione con colorazione MGG (fig. S14E), oltre a tachizoiti positivi all'immunocitochimica anti-*N. caninum* e frammenti antigenici positivi, possibile indice di una fagocitosi e/o di una processazione antigenica (fig. S14F). L'immunocitochimica anti-MHCII ha invece dato

positività moderata-diffusa sia nei macrofagi infetti che in quelli non infetti, risultando pertanto poco significativa.

Infezione delle cellule dendritiche bovine e immunocitochimica con anti-MHCII –
L'esito dell'infezione delle DC è stato positivo, ed è rappresentato nelle figure S16A-F. L'immunocitochimica anti-*N. caninum* ha dato esito positivo sia nei confronti di materiale antigenico (fig. S16A; nuovamente, tale osservazione è compatibile con fenomeni di processazione antigenica, vista anche la sovrapposizione con l'area di positività per MHCII) che nei confronti di parassiti interi (S16B-C), probabilmente osservati in diverse fasi della penetrazione delle cellule. L'immunocitochimica anti-MHCII ha permesso di evidenziare come tale recettore nelle DC infette sia stato espresso sia a livello superficiale e di dendriti, sia a livello diffuso citoplasmatico, in misura apparentemente più intensa rispetto alle DC non infette (fig.S16D-F). Questi risultati suggeriscono che le cellule dendritiche sono in grado di processare e presentare *N. caninum*.

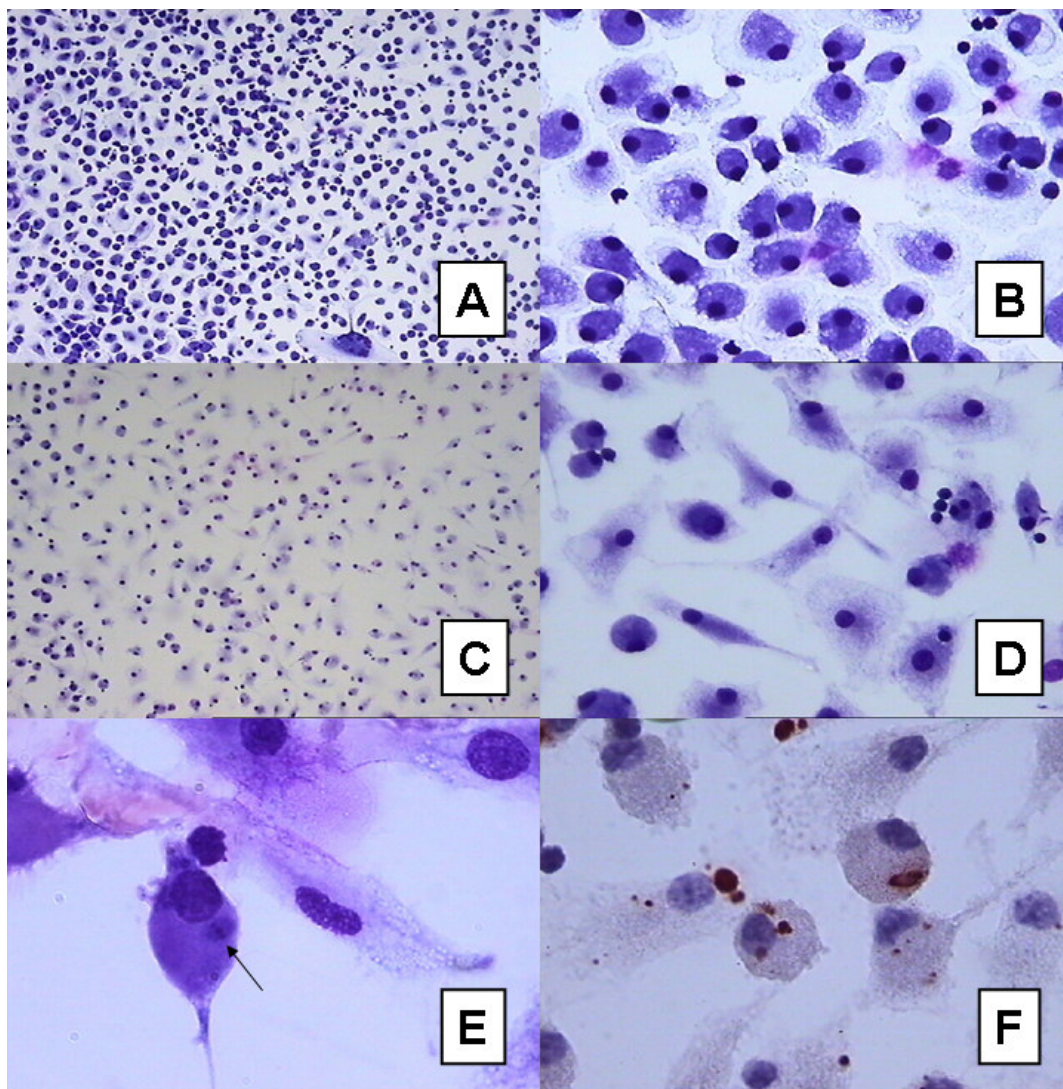


Figura S14. Infezione dei macrofagi bovini. A. Macrofagi derivati da PBMC di bovino non infetti (10x) B. Macrofagi derivati da PBMC di bovino non infetti (40x). C. Macrofagi derivati da PBMC di bovino 24 ore p.i. con *N. caninum* (10x) D. Macrofagi derivati da PBMC di bovino 24 ore p.i. con *N. caninum* (40x) E. Macrofagi derivati da PBMC di bovino 24 ore p.i. con *N. caninum*; si può notare (freccia) la presenza di tachizoiti in replicazione a livello citoplasmatico (100x) A-E colorazione MGG modificata F. Macrofagi derivati da PBMC di bovino 24 ore p.i. con *N. caninum* (40x, ABC-HRP anti-*N. caninum*). Si notano detriti di *N. caninum* (probabile indice di un inizio di processazione antigenica) e alcuni tachizoiti positivi alla reazione immunocitochimica (indice di infezione).

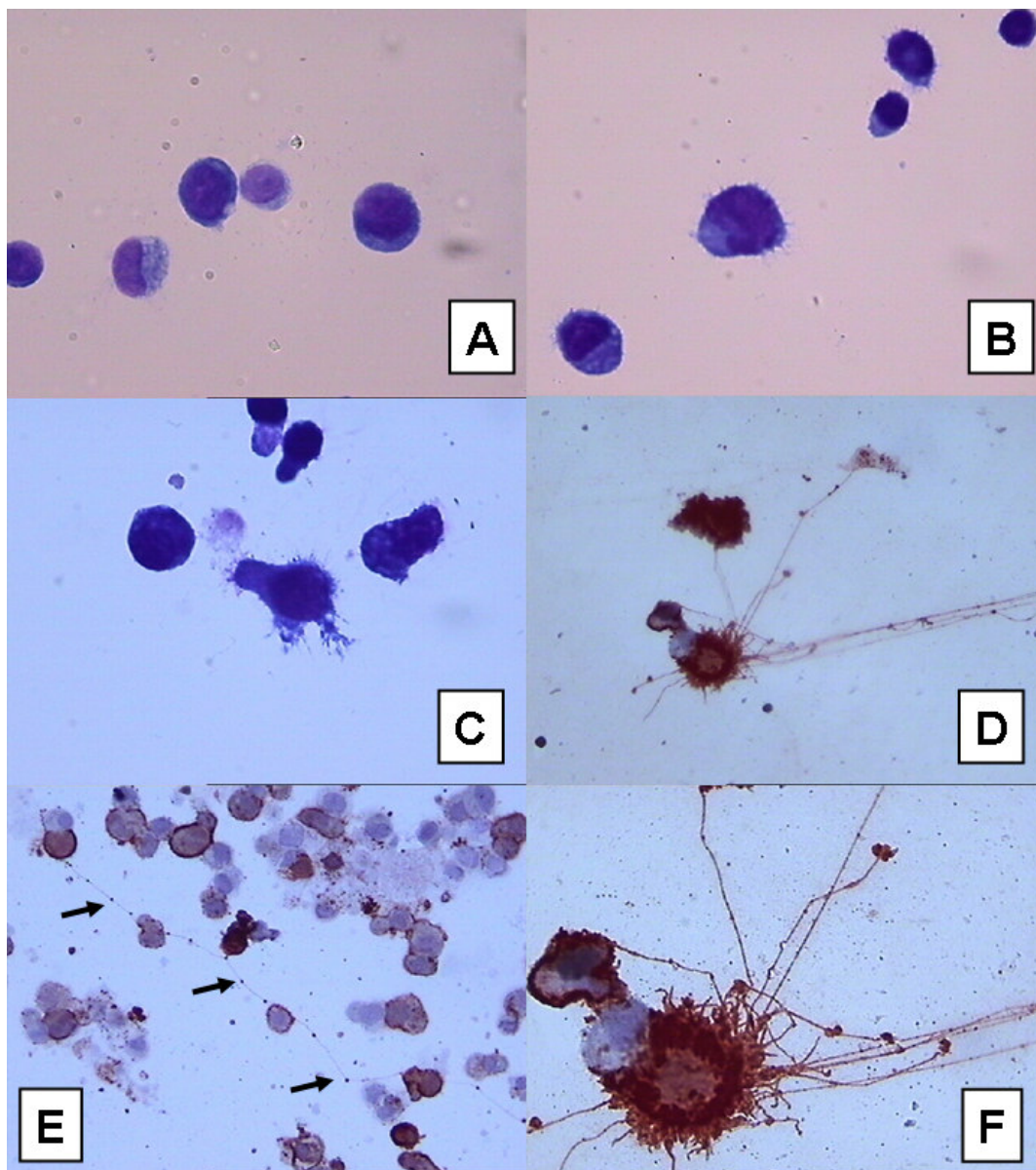


Figura S15. Generazione delle DC di bovino.

A-C: cellule non aderenti citocentrifugate a diversi intervalli di tempo d'incubazione con il TCCM: 4 (A), 6 (B) e 8 (C) giorni di incubazione. Colorazione MGG (100x). La natura dendritica delle cellule è confermata dalla non aderenza e dalla morfologia (prolungamenti citoplasmatici). La morfologia dendritica è sempre più evidente col progredire del tempo di incubazione a contatto con il TCCM.

D-F: citocentrifugati del surnatante all'8° giorno di incubazione con TCCM, immunocitochimica anti-MHCII. (D). Cellula fortemente positiva in superficie e nei prolungamenti (40x). (E). Le frecce indicano un prolungamento citoplasmatico positivo per MHCII che collega alcune cellule (40x). (F). Ingrandimento 100x della figura D. Il TCCM porta probabilmente alla generazione di DC mature. La natura dendritica delle cellule è confermata dalla forte espressione di MHCII in superficie ed in associazione ai prolungamenti citoplasmatici.

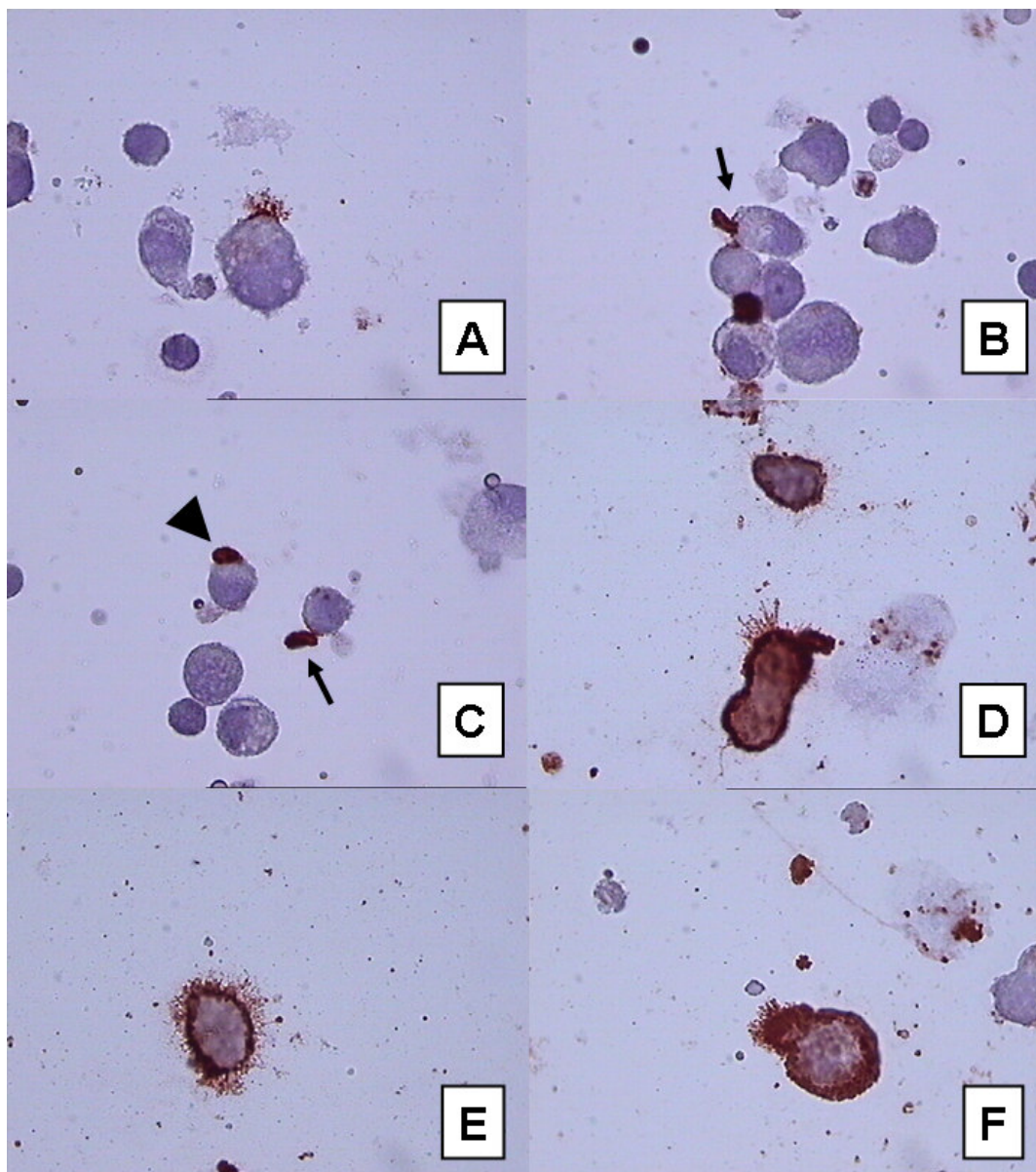


Figura S16. Infezione delle DC di bovino. Citocentrifugati di cellule in sospensione dopo 8 giorni d'incubazione con il TCCM 24 ore p.i. con *N. caninum*. (100x).

A-C (immunocitochimica anti-*N. caninum*): (A). Positività agli antigeni di *N. caninum* in posizione apicale (probabilmente dendriti); (B). Tachizoite di *N. caninum* probabilmente in fase di penetrazione (freccia); (C) Tachizoiti di *N. caninum* in fase di primo contatto (freccia) e in fase avanzata d'ingresso (submembrana, punta di freccia).

D-F (immunocitochimica anti-MHCII bovino): Forte positività dei processi apicali e diffusa al citoplasma. La positività a MHCII delle DC sembra essere più intensa nelle cellule infette.

5.2.2 – Generazione di DC di cane con citochine ricombinanti e loro infezione con *Leishmania infantum*.

Nella specie canina, a differenza della specie bovina, sono disponibili in commercio le citochine ricombinanti necessarie alla generazione delle DC (IL-4 e GM-CSF). Questa situazione costituisce un prezioso vantaggio, visto che la generazione di TCCM, sebbene non richieda materiali costosi, comporta un ulteriore utilizzo di sangue della specie animale oggetto di studio. Nel cane pertanto, per poter osservare i primi eventi che seguono il contatto tra le DC e *L. infantum*, si è deciso di impiegare le citochine ricombinanti.

MATERIALI E METODI

Preparazione delle PBMC di cane - La preparazione delle PBMC di cane è stata effettuata con la medesima metodica descritta nella specie bovina, a partire però dal sangue di cani di proprietà sottoposti a controlli clinici routinari presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico dell'Università di Parma, previo consenso informato e dopo l'approvazione del Comitato Etico dell'Università di Parma. Da ciascun cane (di grossa taglia) è stato prelevato un quantitativo massimo di 50ml di sangue (vedi parte 5.2.1).

Generazione DC con citochine ricombinanti (secondo Ibisch C. et al., 2005) – In piastre multiwell da 6 pozzetti sono state seminate 12×10^6 PBMC di cane per ciascun pozzetto e successivamente sono state incubate nel termostato a 37°C per 2 ore, in terreno di coltura RPMI 1640 completo e supplementato con il 10% di siero fetale bovino. Dopo 2 ore, quando circa il 30% delle cellule aveva aderito alla piastra e le cellule non aderenti sono state rimosse mediante 2 delicati lavaggi con PBS. Le cellule aderenti (monociti) sono state invece incubate con 2ml/pozzetto di terreno di coltura RPMI 1640 completo e supplementato con il 10% di siero fetale bovino; a tale terreno sono state aggiunte le citochine ricombinanti canine IL-4 e GM-CSF (R&D, USA) alla concentrazione finale

di era rispettivamente di 50 ng/ml per la prima e di 33ng/ml per la seconda. Ogni due o tre giorni è stata aggiunta una pari quantità di terreno di coltura (completo e supplementato con il 10% di siero fetale bovino) contenente le citochine ricombinanti alla concentrazione sopra riportata. Dopo una settimana la differenziazione in DC era completa, e si è proceduto alla citocentrifugazione delle cellule non aderenti, sia infette che non infette con *L. infantum*.

Coltivazione di Leishmania infantum – I promastigoti di *Leishmania infantum* impiegati nella presente ricerca appartengono al ceppo IPT1 dell'Istituto Superiore di Sanità (Roma) e sono stati gentile dono dell'Università di Torino. La propagazione dei promastigoti non ha richiesto la presenza di substrati cellulari, e pertanto gli sforzi maggiori per stabilire e poi mantenere la coltura nelle condizioni migliori sono stati dedicati all'allestimento del terreno e ad un accurato rispetto delle temperature e condizioni di incubazione.

Il medium impiegato per la coltivazione dei promastigoti di *L. infantum* ha la seguente composizione (valori per ottenere 50ml di terreno):

- 75 ml Medium 199 (con L-Glutammina inclusa, Euroclone, Milano)
- 20 ml FCS scomplementato (Euroclone, Milano)
- 1 ml Penicillina (100 U/ml)/Streptomicina (100 µg/ml) (Gibco, Italia)
- 4 ml HEPES 40 mM (Sigma Aldrich, Italia)
- 10 µl di soluzione stock di adenina (135,1 mg/ml in HEPES 50mM) (Sigma Aldrich, Italia)
- 20 µl di soluzione stock di emina (25 mg/ml in 50% trietanolamina) (Sigma Aldrich, Italia)
- 2 µl di soluzione stock di biotina (50 mg/ml in 95% etanolo) (Sigma Aldrich, Italia)

I promastigoti sono stati coltivati in provette sterili; la capacità della provetta e il volume di coltura dipendevano dalle quantità di promastigoti necessari. In ogni caso la coltura è stata mantenuta al buio (i promastigoti sono altamente fotosensibili) e a +24°C. A partire da una coltura già pronta il passaggio è avvenuto rigorosamente a una

settimana dall'inizio della propagazione, tempo che consente di raggiungere il plateau della replicazione, oltre il quale aveva inizio la morte dei promastigoti e la comparsa di forme "rotondeggianti". Il passaggio della coltura è stato fatto inoculando una quantità di coltura della settimana precedente in terreno nuovo in rapporto 1:10 (ad esempio, 0,5 ml di coltura in 5 ml di terreno nuovo). Al momento del passaggio era importante controllare una goccia di coltura al microscopio, per accertarsi che la crescita fosse regolare e che non ci fossero promastigoti sofferenti/morti o che la coltura fosse poco efficiente. In caso di difficoltà nel rispettare i tempi del passaggio o in caso di sospensione intenzionale della coltura si è provveduto al congelamento in azoto liquido dei promastigoti; in tal caso, per riprendere la coltura è stato necessario osservare frequentemente l'andamento della crescita che si presentava rallentata nei primi giorni/settimane.

Infezione delle DC con L. infantum – L'infezione con promastigoti di *L. infantum* è stata effettuata aggiungendo in ciascun pozzetto 2ml di sospensione di coltivazione di leishmania contenente $2,4 \times 10^6$ promastigoti/ml, per un totale di $4,8 \times 10^6$ promastigoti.

Citocentrifugazione delle cellule, colorazione May Grünwald Giemsa modificata e immunocitochimica – Le cellule in sospensione, al termine del periodo di incubazione con le citochine sono state citocentrifugate e poi fissate su vetrini polilisinati (Bio Optica, Italia) in maniera analoga a quanto descritto nella parte 5.2.1. Allo stesso modo è stata effettuata la colorazione MGG modificata.

In aggiunta alla colorazione May-Grunwald-Giemsa modificata per la caratterizzazione morfologica, a 24 ore dall'infezione le DC generate con IL-4 e GM-CSF sono state sottoposte all'immunocitochimica impiegando i seguenti anticorpi primari (sviluppati nel topo):

anti-MHCII (Clone CA2.1C12, IgG1, Serotec, UK), alla diluizione 1:10
anti-CD1c (Clone CA13.9H11, IgG1, Serotec, UK), alla diluizione 1:10
anti-CD1a (Clone CA9.AG5, IgG1, Serotec, UK), alla diluizione 1:10
anti-CD86 (Clone IT2.2, IgG2b, BD Pharmingen, Italy), alla diluizione 1:10

Il protocollo di immunocitochimica impiegato è quello descritto nella parte 5.1.1.

RISULTATI

Generazione DC con citochine ricombinanti e loro infezione con L. infantum – Le cellule dendritiche generate con citochine ricombinanti avevano il caratteristico aspetto delle DC immature, vale a dire l'aspetto di “veiled cells”, talvolta associato a presenza di estesi dendriti (figure S17A-F). A causa della metodica impiegata (sola aggiunta di terreno di coltura) non è stato possibile seguire lo sviluppo e la modificazione morfologica in senso dendritico, al pari di quanto effettuato nella generazione con TCCM. Per quanto riguarda l'infezione con *L. infantum*, è stato possibile osservare la presenza di amastigoti all'interno delle DC già 24 ore p.i. (figure S17 A-B, E-F).

Immunocitochimica delle DC generate con IL-4 e GM-CSF – I dati preliminari ottenuti dall'immunocitochimica non hanno permesso di evidenziare positività delle DC generate tranne che per l'espressione di MHCII (figura S7D-F). L'assenza di espressione degli altri recettori (dati non presentati) potrebbe essere sia dovuta alla parziale maturazione conferita alle DC dalle citochine ricombinanti, sia al potenziale ruolo dell'infezione (vedi capitolo 4).

La positività a MHCII è un importante marker considerato caratteristico delle DC, anche immature (Ibisch C. et al., 2005), e la sua espressione è almeno in parte una conferma della natura dendritica delle cellule generate, insieme all'aspetto “veiled” (figura S17E-F)

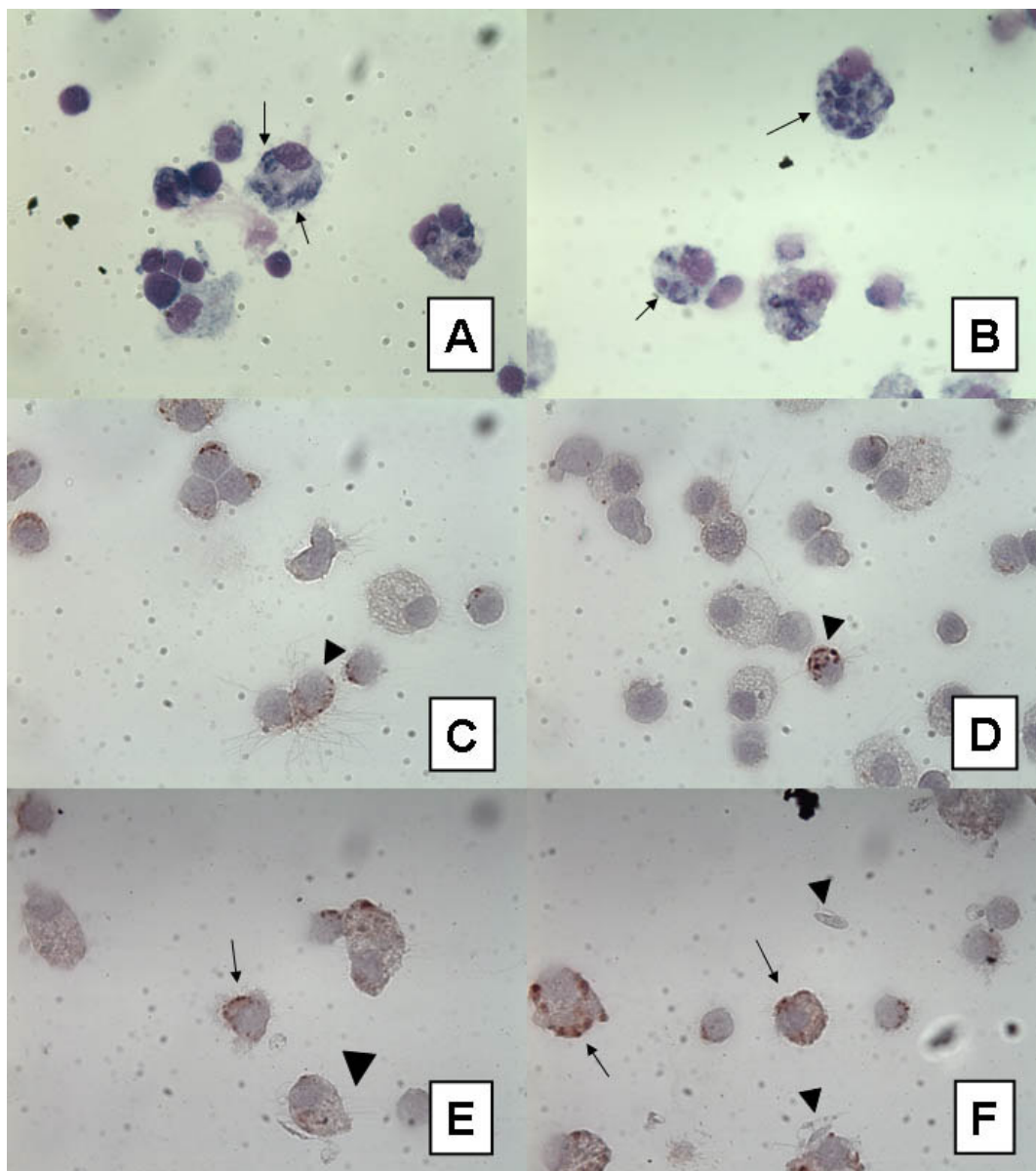


Figura S17. Generazione e infezione con *L. infantum* delle DC di cane. Citocentrifugati di cellule in sospensione dopo 7 giorni d'incubazione con IL-4 e GM-CSF.

A-B (MGG modificata, 100x): (A). Aspetto "dendritico" delle cellule e presenza (freccie) di amastigoti all'interno del citoplasma.

C-D (immunocitochimica anti-MHCII, 100x) Cellule non infette; si noti la positività granulare intracitoplasmatica e di superficie a MHCII e la presenza di numerosi dendriti (punte di freccia).

E-F (immunocitochimica anti-MHCII, 100x) Cellule infette; si noti ancora la positività granulare intracitoplasmatica e di superficie a MHCII associati a "veiled cells" (freccie); in questo caso si possono osservare dei promastigoti liberi (punte di freccia).

DISCUSSIONE

Le attuali conoscenze sulla patogenicità di *N. caninum* e sulla sua capacità di indurre l'aborto indicano come principale responsabile di tale evento la riattivazione dell'infezione cronica cui conseguirebbero il rilascio e la proliferazione di tachizoiti all'interno della placenta, a loro volta responsabili del danno fetale correlato alla risposta infiammatoria. Allo stesso modo, la patogenesi della leishmaniosi canina è strettamente correlata al tipo di risposta immunitaria che insorge nell'animale infetto, protettiva o meno. La disponibilità di un modello in vitro basato su colture primarie per lo studio della risposta pro-infiammatoria (innata e/o acquisita) potrebbe contribuire alla comprensione dei meccanismi responsabili dello sviluppo delle malattie quali la neosporosi clinica (caratterizzata dall'aborto) e la leishmaniosi viscerale canina. Inoltre, tra le potenziali applicazioni del siffatto modello rientra l'identificazione degli antigeni parassitari in grado di evocare una risposta protettiva, fase indispensabile per lo sviluppo di strategie immunizzanti efficaci contro *N. caninum* e *L. infantum*. In questi esperimenti è stato messo a punto su più livelli un modello di infezione della cellula presentante l'antigene (macrofagi e DC di bovino, DC di cane), indispensabile per comprendere i primi eventi che si verificano in seguito all'infezione. È stato inoltre dimostrato che è possibile generare DC di bovino senza l'utilizzo di citochine ricombinanti e che queste cellule sono recettive all'uptake e processazione di *N. caninum*, offrendo uno strumento potenzialmente importante per il futuro studio dell'interazione ospite-parassita. Sebbene per ora non siano ancora presenti dati sulla funzionalità in termini di interazione delle DC ottenute in vitro e infettate con altre cellule del sistema immunitario e in termini di mediatori prodotti in seguito all'infezione, la capacità dei protozoi considerati di interagire con tali cellule è un'importante acquisizione. Nel caso di *T. gondii*, oltre a quanto già riassunto sull'interazione con le DC, è stato dimostrato come la loro infezione possa aiutare la disseminazione del parassita nell'organismo (Lambert H. et al., 2006). Per quanto riguarda il cane, invece, in base ai dati preliminari in nostro possesso è altamente probabile che *L. infantum* possa infettare le DC (immature). Il nostro gruppo di ricerca ha già dimostrato in vivo come il contatto tra l'antigene di *L. infantum*, sia in forma di promastigoti interi che di promastigoti disgregati sia stato in grado, in animali

sensibilizzati, di causare l'attivazione e la maturazione antigene-specifica delle DC della cute del cane, con la comparsa di strutture caratteristiche sia della produzione di molecole MHCII che caratteristiche e proprie delle DC di cane (Sacchi L. et al., 2006).

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare vivamente tutti coloro che hanno contribuito allo svolgimento di questa ricerca, in maniera più o meno diretta:

La Prof.ssa Laura Kramer, per la fiducia accordatami, per le fondamentali discussioni sulle questioni immunologiche e parassitologiche; da ultimo (non per importanza), mi ha permesso di svolgere fisicamente la ricerca e di considerare in maniera sempre concreta l'immunoparassitologia veterinaria, un settore molto difficile da delimitare senza allontanarsi troppo dalla realtà quotidiana.

Il Prof. Gaetano Donofrio, soprattutto per avermi introdotto agli aspetti molecolari della ricerca veterinaria, troppo spesso considerati lontani e inavvicinabili. Anche se spesso a causa di difficoltà strutturali non sempre sono alla nostra portata, devono però essere inequivocabilmente l'obiettivo verso cui tendere, senza lasciarsi travolgere dalla "υβρις" (superbia).

Mia moglie Désirée, per avere contribuito alla stesura e alla revisione delle parti più complesse del presente lavoro, quando rischiavo di "perdere il filo" e per avere sopportato la mia presenza anche in momenti ricchi di stress, nei quali si diventa sicuramente insopportabili.

I colleghi della Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Prof. Paolo Borghetti e Dott.ssa Elena De Angelis, per il fondamentale contributo riguardante la citofluorimetria e le discussioni sull'immunologia veterinaria.

Il Dott. Federico Righi, per il supporto logistico negli spostamenti piccoli e grandi (tra cui i numerosi traslochi) di questi anni, nonché per le iniezioni di entusiasmo e ilarità nei momenti opportuni.

Il Prof. Primo Mariani, coordinatore del Corso di Dottorato, per la autonomia e la flessibilità concessemi, indispensabili in un Dottorato che abbraccia settori scientifici così eterogenei ma strutturali della Medicina Veterinaria.

Il Prof. Claudio Genchi, maestro e sicuro riferimento della parassitologia (veterinaria e non), che ben comprende (e in parte condivide) quali possano essere i legami affettivi con Trieste, la mia città natale.

Nagul (Dott. Arunasalm Naguleswaran), Prof. Andrew Hemphill e Prof. Bruno Gottstein, dell'Università di Berna, per avermi ospitato e offerto una delle esperienze scientifiche più intense della mia vita.

Infine, un grazie ai miei genitori e a mio fratello, "fondamenta" nel bene e nel male di gran parte della mia persona.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH (2003). Cellular and molecular immunology, 5th edition, Saunders, Philadelphia, USA.
- Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL (1991). An experimental model for canine Leishmaniasis. *Parasite Immunol* 13, 537–550.
- Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143–150.
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86–89.
- Alexander J, Brombacher F, McGachy HA, McKenzie AN, Walker W, Carter KC (2002). An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. *Eur J Immunol* 32, 2923–2933.
- Alexander J, Schariton-Kersten TM, Yap G, Roberts CW, Liew FY, Sher A (1997). Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 1355–1359.
- Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, Sher A (2000). CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 α + dendritic cells. *Nat Immunol* 1, 83–87.
- Aliberti J, Hieny S, Reis e Sousa C, Serhan CN, Sher A (2002). Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by dendritic cells: A mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat Immunol* 3, 76–82.
- Aliberti J, Serhan C, Sher A (2002b). Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J Exp Med* 196, 1253–1262.
- Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, Reis e Sousa C, Fairlamb A, Ribeiro JM, Sher A (2003). Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol* 4, 485–490.
- Aliberti J, Jankovic D, Sher A (2004). Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol Rev*, 201, 26–34.
- Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM (2005). Anti*Leishmanial* antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 151–158.
- Almeria S, De Marez T, Dawson H, Araujo R, Dubey JP, Gasbarre LC (2003). Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol* 25, 383–392.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López Vélez T, Molina R, Moreno J (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10, 298–319.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J (2004). Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57, 1–88.

- Amprey JL, Späth GF, Porcelli SA (2004). Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 72, 589-592.
- Andrianarivo AG, Barr BC, Anderson ML, Rowe JD, Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA (2001). Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol Res* 87, 817-825.
- Andrianarivo AG, Anderson ML, Rowe JD, Gardner IA, Reynolds JP, Choromanski L, Conrad PA (2005). Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasitol Res* 96, 24-31.
- Antoine JC, Prina E, Courret N, Lang T (2004). *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Adv Parasitol* 58, 1-68.
- Aosai F, Chen M, Kang HK, Mun HS, Norose K, Piao LX, Kobayashi M, Takeuchi O, Akira S, Yano A (2002). *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein HSP70 functions as a B cell mitogen. *Cell Stress Chaperones* 7, 357-364.
- Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA (2007). Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 40, 97-112.
- Arbo A, Pavía-Ruz N, Santos JI (2006). Opsonic requirements for the respiratory burst of neutrophils against *Giardia lamblia* trophozoites. *Arch Med Res* 37, 465-73.
- Arroyo R, Alderete JF (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 57, 2991-2997.
- Athanassakis I, Iconomidou B (1996). Cytokine production in the serum and spleen of mice from day 6 to 14 of gestation: cytokines/placenta/spleen/serum. *Dev Immunol* 4, 247-255.
- Attallah AM, Lewis FA, Urritia-Shaw A, Folks T, Yeatman TJ (1980). Natural killer cells (NK) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) components of *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 63, 351-354.
- Baetz AL, Leiting SE, Bryner J, Barnett D (1981). Prepartum changes of plasma concentrations of prostaglandin F and 13, 14-dihydro-15-ketoprostaglandin metabolites in pregnant animals exposed to *Sarcocystis cruzi* or *Campylobacter fetus*. *Am J Vet Res* 42, 22-24.
- Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A (2006). TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 177, 3515-3519.
- Bannenberg GL, Aliberti J, Hong S, Sher A, Serhan C (2004). Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A4 biosynthesis. *J Exp Med* 199, 515-523.
- Barbiéri CL (2006). Immunology of canine Leishmaniasis. *Parasite Immunol* 28, 329-337.

- Barnes A, Bee A, Bell S, Gilmore W, Mee A, Morris R, Carter SD (2000). Immunological and inflammatory characterisation of three canine cell lines: K1, K6 and DH82. *Vet Immunol Immunopathol* 75, 9-25.
- Barral A, Barral-Netto M, Almeida R, Ribeiro De Jesus A, Grimaldi G Jr, Netto EM, Santos I, Bacellar O, Carvalho EM (1992). Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am J Trop Med Hyg* 47, 587-592.
- Barriga OO (1997). *Veterinary Parasitology for Practitioners*, 2nd edition, Burgess International Group, Edina, USA.
- Barry JD, Turner CMR (1992). The dynamics of antigenic variation and growth of African trypanosomes. *Parasitol Today* 7, 207-211.
- Bartley PM, Kirvar E, Wright S, Swales C, Esteban-Redondo I, Buxton D, Maley SW, Schock A, Rae AG, Hamilton C, Innes EA (2004). Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at midgestation. *J Comp Pathol* 130, 81-91.
- Baszler TV, Long MT, Mcelwain TF, Mathison BA (1999). Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 29, 1635-1646.
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A (2003). *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through Toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 130, 65-74.
- Benderitter T, Casanova P, Nashkidachvili L, Quilici M (1988). Glomerulonephritis in dogs with canine Leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 82, 335-341.
- Bienzle D, Reggeti F, Clark ME, Chow C (2003). Immunophenotype and functional properties of feline dendritic cells derived from blood and bone marrow. *Vet Immunol Immunopathol* 96, 19-30.
- Bing RJ, Dudek R, Kähler J, Narayan KS, Ingram M (1992). Cytokine production from freshly harvested human mononuclear cells attached to plastic beads. *Tissue Cell* 24, 203-209.
- Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J (1984). Unidentified cyst-forming-sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd* 70, 271-274.
- Björkman C, Johansson O, Stenlund S, Holmdahl OJM, Ugglå A (1996). *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *JAVMA* 208, 1441-1444.
- Bliss SK, Gavrilescu C, Alcaraz A, Denkers EY (2001). Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun* 69, 4898-4905.
- Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* 28, 340-345.
- Bourdeau P, Groulade P (1988). Results of an inquiry into Leishmaniasis. *Prat Med Chir Anim* 23, suppl 5, 5-10.
- Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L (1997). Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 59, 21-30.
- Bowie AG, Fitzgerald KA (2007). RIG-I: trying to discriminate between self and non-self RNA. *Trends Immunol* 28, 147-150.

- Boysen P, Klevar S, Olsen I, Storset AK (2006). The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. *Infect Immun* 74, 953-960.
- Bray RS (1983). *Leishmania*: chemotactic responses of promastigotes and macrophages in vitro. *J Protozool* 30, 322-329.
- Brown WC, Rice-Ficht AC, Estes DM (1998). Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol* 63, 45-55.
- Brownlie J, Clarke MC (1993). Experimental and spontaneous mucosal disease of cattle: a validation of Koch's postulates in the definition of pathogenesis. *Intervirology* 35, 51-59.
- Bunn-Moreno MM, Madeira ED, Miller K, Menezes JA, Campos-Neto A (1985). Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. *Clin Exp Immunol* 59, 427-434.
- Butterworth AEB (1994). Human immunity to schistosomes: some questions. *Parasitol Today* 10, 378-380.
- Buxton D, Maley SW, Thomson KM, Trees AJ, Innes EA (1997). Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J Comp Pathol* 117, 1-16.
- Buxton D, McAllister MM, Dubey JP (2002). The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol* 18, 546-552.
- Campos MAS, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167, 416-423.
- Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, Ropert C, Gazzinelli RT (2004). Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 172, 1711-1718.
- Campos-Martín Y, Colmenares M, Gozalbo-López B, López-Núñez M, Savage PB, Martínez-Naves (2006). Immature human dendritic cells infected with *Leishmania infantum* are resistant to NK-mediated cytotoxicity but are efficiently recognized by NKT cells. *J Immunol* 176, 6172-6179.
- Candolfi E, Villard O, Thouvenin M, Kien TT (1996). Role of nitric oxide-induced immune suppression in toxoplasmosis during pregnancy and in infection by a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219, 141-154.
- Caparrós E, Serrano D, Puig-Kröger A, Riols L, Lasala F, Martinez I, Vidal-Vanaclocha F, Delgado R, Rodríguez-Fernández JL, Rivas L, Corbí AL, Colmenares M (2005). Role of the C-type lectins DC-SIGN and LSIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology* 210, 185-193.
- Carayannopoulos LN, Yokoyama WM (2004). Recognition of infected cells by natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 16, 26-33.
- Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M (1998). Use of a leishmanin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol* 79, 213-220.
- Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks DL (1996). *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in

- bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 183, 515-526.
- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388, 782-787.
 - Chakraborty D, Banerjee S, Sen A, Banerjee KK, Das P, Roy S (2005). *Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. *J Immunol* 175, 3214-3224.
 - Chamizo C, Moreno J, Alvar J (2005). Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine Leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 103, 67-75.
 - Chang KP (1979). *Leishmania donovani*: promastigote-macrophage surface interaction in vitro. *Exp Parasitol* 48, 175-189.
 - Chen L, Watanabe T, Watanabe H, Sendo F (2001). Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c but protect C57BL/6 mice through modulating the T1/T2 dichotomy in different directions. *Eur J Immunol* 31, 265-275.
 - Chen M, Aosai F, Norose K, Mun HS, Takeuchi O, Akira S, Yano A (2002). Involvement of MyD88 in host defense and the down-regulation of anti-heat shock protein 70 autoantibody formation by MyD88 in *Toxoplasma gondii*-infected mice. *J Parasitol* 88, 1017-1019.
 - Chen M, Mun HS, Piao LX, Aosai F, Norose K, Mohamed RM, Belal US, Fang H, Ahmed AK, Kang HK, Matsuzaki G, Kitamura D, Yano A (2003). Induction of protective immunity by primed B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected B cell-deficient mice. *Microbiol Immunol* 47, 997-1003.
 - Chiang N, Fierro IM, Gronert K, Serhan CN (2000). Activation of lipoxin A (4) receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. *J Exp Med* 191, 1197-1208.
 - Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A (1997). A retrospective clinical study of canine Leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 141, 539-543.
 - Clark GJ, Angel N, Kato M, Lopez JA, MacDonald K, Vuckovic S, Hart DN (2000). The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes Infect* 2, 257-272.
 - Clark IA (2007). How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 18, 335-343.
 - Clark R, Kupper T (2005). Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 125, 629-637.
 - Collantes-Fernandez E, Arnaiz-Seco I, Burgos BM, Rodriguez-Bertos A, Aduriz G, Fernandez-Garcia A, Ortega-Mora LM (2006). Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. *Vet Parasitol* 142, 187-191.
 - Colmenares, M, Puig-Kröger A, Pello OM, Corbí AL, Rivas L (2002). Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DC, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J Biol Chem* 277, 36766-36769.

- Colmenares M, Corbí AL, Turco SJ, Rivas L (2004). The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J Immunol* 172, 1186–1190.
- Constant SL, Bottomly K (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: The alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15, 297–322.
- Costa FA, Guerra JL, Silva SM, Klein RP, Mendonca IL, Goto H (2000). CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral Leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 33, 1455-1458.
- Culley FJ, Bodman-Smith KB, Ferguson MA, Nikolaev AV, Shantilal N, Raynes JG (2000). C-reactive protein binds to phosphorylated carbohydrates. *Glycobiology* 10, 59–65.
- Danilova N (2006). The evolution of immune mechanisms. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 306, 496-520.
- Dann SM, Wang HC, Gambarin KJ, Actor JK, Robinson P, Lewis DE, Caillat-Zucman S, White AC Jr (2005). Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan *Cryptosporidium*. *J Infect Dis* 192, 1294–1302.
- Darcy F, Santoro F (1994). Toxoplasmosis. In *Parasitic Infections and the Immune System*, ed. Kierszenbaum F, Academic Press, New York.
- De Carneri I (1997). *Parassitologia generale e umana* – 12ma edizione. A cura di Claudio Genchi, CEA, Milano.
- De Luna R, Vuotto ML, Ielpo MTL, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscatiello V, Ciaramella P, Scalone A, Gradoni L, Mancino D (1999). Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 70, 95–103.
- De Trez C, Brait M, Leo O, Aebischer T, Torrentera FA, Carlier Y, Muraille E (2004). Myd88-dependent in vivo maturation of splenic dendritic cells induced by *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species. *Infect Immun* 72, 824–832.
- de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L (2003). MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol* 33, 2822–2831.
- de Wit PJ (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* 64, 2726-2732.
- Del Rio L, Butcher BA, Bennouna S, Hieny S, Sher A, Denkers EY (2004). *Toxoplasma gondii* triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors. *J Immunol* 172, 6954–6960.
- DeMarez T, Liddell S, Dubey JP, Jenkins MC, Gasbarre L (1999). Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int J Parasitol* 29, 1647–1657.
- Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J (1995). Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol* 17, 451-458.
- Dieu-Nosjean M C, Vicari A, Lebecque S, Caux C (1999). Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* 66, 252-262.

- Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths F, Wouda W, Barkema HW (2001). Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol* 31, 747-752.
- Dominguez M, Torano A (1999). Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *J Exp Med* 189, 25-35.
- Drennan MB, Stijlemans B, Van den Abbeele J, Quesniaux VJ, Barkhuizen M, Brombacher F, De Baetselier P, Ryffel B, Magez S (2005). The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent. *J Immunol* 175, 2501-2509.
- Dubey JP (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 41, 1-16.
- Dubey JP, Lindsay DS (1993). Neosporosis. *Parasitol Today* 9, 452-458.
- Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkas I, Björkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattson JG, McAllister MM, Modry D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton JS, Williams DJL, Lindsay DS (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol* 32, 929-946.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol* 134, 267-289.
- Engeland IV, Waldeland H, Kindahl H, Ropstad E, Andresen O (1996). Effect of *Toxoplasma gondii* infection on the development of pregnancy and on endocrine foetal-placental function in the goat. *Vet Parasitol* 67, 61-74.
- Entrican G (2002). Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J Comp Pathol* 126, 79-94.
- Éperon S, Broenniman K, Hemphill A, Gottstein B (1999). Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (μ MT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol* 21, 225-236.
- Fanger NA, Voigtlaender D, Liu C, Swink S, Wardwell K, Fisher J, Graziano RF, Pfefferkorn LC, Guyre PM (1997). Characterisation of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD 64) expressed on human blood dendritic cells. *J Immunol* 158, 3090-3098.
- Feizi T (2000). Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity. *Immunol Rev* 173, 79-88.
- Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* 7, 862-74.
- Ferroglio E, Pasino M., Romano A, Grande D, Pregel P, Trisciuoglio A (2007). Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. *Vet Parasitol* 148, 346-349.
- Flandin JF, Chano F, Descoteaux A (2006). RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- γ -primed macrophages. *Eur J Immunol* 36, 411- 420.
- Foley GL, Schlafer DH, Elsasser TH, Mitchell M (1993). Endotoxemia in pregnant cows: comparisons of maternal and fetal effects utilizing the chronically catheterized fetus. *Theriogenol* 39, 739-762.

- Fondevila D, Vilafranca M, Ferrer L (1997). Epidermal immunocopetence in canine Leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 56, 319-327.
- Font A, Roura X, Fondevila D, Closa JM, Mascort J, Ferrer L (1996). Canine mucosal Leishmaniasis. *JAAHA* 32, 131-137.
- Freedman DO (1998). Immune dynamics in the pathogenesis of human lymphatic filariasis. *Parasitol Today* 14, 229-234.
- Galvao-Castro B, Sa Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH (1984). Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral Leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 56, 58-66.
- García-Alonso M, Nieto CG, Blanco A, Requena JM, Alonso C, Navarrete I (1996). Presence of antibodies in the aqueous humor and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features of the central nervous system. *Parasite Immunol* 18, 539-546.
- Garg R, Trudel N, Tremblay MJ (2007). Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells. *Trends Parasitol* 23, 317-324.
- Gazzinelli RT, Hayashi S, Wysocka M, Carrera L, Kuhn R, Müller W, Roberge F, Trinchieri G, Sher A (1994). Role of IL-12 in the initiation of cell-mediated immunity by *Toxoplasma gondii* and its regulation by IL-10 and nitric oxide. *J Eukaryot Microbiol* 41, 9S.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharton-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . *J Immunol* 157, 798-805.
- Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A (1996a). Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219, 127-139.
- Gazzinelli RT, Denkers EY (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 6, 895-906.
- Geijtenbeek, TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585.
- Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, Russo DM, Reed SG (1993). Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest* 92, 324-329.
- Ghosh M, Bandyopadhyay S (2004). Interaction of *Leishmania* parasites with dendritic cells and its functional consequences. *Immunobiology* 209, 173-177.
- Ghosh M, Mandal L, Maitra S, Rakshit S, Paul K, Bagchi J, Ganguly D, Pal C, Bandyopadhyay S (2006). *Leishmania donovani* infection of human myeloid dendritic cells leads to a Th1 response in CD4+ T cells from healthy donors and patients with kala-azar. *J Infect Dis* 194, 294-301.
- Gondim LFP, Gao L, McAllister MM (2002). Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J Parasitol* 88, 1159-1163.

- Gondim M, McAllister MM, Anderson-Sprecher RC, Björkman C, Locks TF, Firkins LD, Gao L, Fiskher WR (2005). Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *J Parasitol* 90, 1394–1400.
- Gradoni L, Gramiccia M (2004). Phylum Sarcomastigophora. In “De Carneri – Parassitologia generale e umana, eds. Genchi C, Pozio E, CEA, Milano.
- Grakoui, A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221–227.
- Gramiccia M (1989). Eziologia e ciclo biologico del parassita. In “La leishmaniosi canina”, ed. Pizzirani S, SCIVAC, Cremona.
- Green PJ, Feizi T, Stoll MS, Thiel S, Prescott A, McConville MJ (1994). Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Biochem Parasitol* 66, 319–328.
- Gruden-Movsesijan A, Milosavljevic LS (2006). The involvement of the macrophage mannose receptor in the innate immune response to infection with parasite *Trichinella spiralis*. *Vet Immunol Immunopathol* 109, 57–67.
- Guy CS, Williams DJL, Kelly DF, McGarry JW, Guy F, Björkman C, Smith RF, Trees AJ (2001). *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet Rec* 149, 443–449.
- Hakim FT, Gazzinelli RT, Denkers E, Hieny S, Shearer GM, Sher A (1991). CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *J Immunol* 147, 2310–2316.
- Haldorson GJ, Stanton JB, Mathison BA, Suarez CE, Baszler TV (2006). *Neospora caninum*: Antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts in vitro. *Exp Parasitol* 112, 172–178.
- Handman E (1999). Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* 44, 1–39.
- Harrus S, Waner T, Friedmann-Morvinski D, Fishman Z, Bark H, Harmelin A (2003). Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Immunol Immunopathol* 96, 239–243.
- Haslam SM, Houston KM, Harnett W, Reason AJ, Morris HR, Dell A (1999). Structural studies of N-glycans of filarial parasites. Conservation of phosphorylcholine-substituted glycans among species and discovery of novel chito-oligomers. *J Biol Chem* 274, 20953–20960.
- Hemphill A (1999). The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv Parasitol* 43, 47–104.
- Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A, Keller N, Riesen M, Guetg N, Srinivasan S, Alaeddine F (2004). Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell. *Microsc Microanal* 10, 602–620.
- Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A (2006). Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology* 133, 261–278.

- Hervás-Rodríguez J, Mozos E, Méndez A, Pérez J, Gómez-Villamandos JC (1986). *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts in vivo. *Vet Pathol* 33, 469-473.
- Howe DK, Sibley LD (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172, 1561-1566.
- Hu W, Yan Q, Shen DK, Liu F, Zhu ZD, Song HD, Xu XR, Wang ZJ, Rong YP, Zeng LC, Wu J, Zhang X, Wang JJ, Xu XN, Wang SY, Fu G, Zhang XL, Wang ZQ, Brindley PJ, McManus DP, Xue CL, Feng Z, Chen Z, Han ZG (2003). Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. *Nat Genet* 35, 139-147.
- Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Rae C, Potter S, Medana IM, Miu J, Ball HJ (2006). Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol* 36, 569-582.
- Hunter CA, Candolfi E, Subauste C, VanCleave V, Remington JS (1995). Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. *Immunology* 84, 16-20.
- Hunter CA, Suzuki Y, Subauste CS, Remington JS (1996). Cells and cytokines in resistance to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219, 113-125.
- Ibesch C, Pradal G, Bach JM, Lieubeau B (2005) Functional canine dendritic cells can be generated in vitro from peripheral blood mononuclear cells and contain a cytoplasmic ultrastructural marker. *J Immunol Methods* 298, 175-182.
- Inal JM (1999). *Schistosoma* TOR (trispinning orphan receptor), a novel, antigenic surface receptor of the blood-dwelling, *Schistosoma* parasite. *Biochim Biophys Acta* 1445, 283-298.
- Inal JM (2004). Parasite interaction with host complement: beyond attack regulation. *Trends Parasitol* 20, 407-412.
- Iniesta L, Gállego M, Portús M (2005). Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 103, 77-81.
- Innes EA, Panton WRM, Marks J, Trees AJ, Holmdahl J, Buxton D (1995). Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum* as shown by incorporation of 3H uracil. *J Comp Pathol* 113, 95-100.
- Innes EA (1997). Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 20, 131-138.
- Innes EA, Buxton D, Éperon S, Gottstein B (2000). Immunology of *Neospora caninum* infection in cattle and mice. *Int J Parasitol* 30, 896-900.
- Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey IM, Buxton D (2001). Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol* 31, 1523-1534.
- Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJ, Conrad PA (2002). Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol* 18, 497-504.
- Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban Redondo I, Buxton D (2005). The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 29-36.
- Innes EA (2007). The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* 134, 1903-1910.

- Jankovic D, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, Collazo CM, Sher A (2002). In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(–/–) setting. *Immunity* 16, 429–439.
- Jenkins MC, Parker C, Hill D, Pinckney RD, Dyer R, Dubey JP (2007). *Neospora caninum* detected in feral rodents. *Vet Parasitol* 143, 161–165.
- Julius MH, Simpson E, Herzenberg LA (1973). A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol* 3, 645–659.
- Kahn S, Wleklinski M, Aruffo A, Farr A, Coder D, Kahn M (1995). *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp Med* 182, 1243–1258.
- Kano R, Masukata Y, Omata Y, Kobayashi Y, Maeda R, Saito A (2005). Relationship between type 1/type 2 immune responses and occurrence of vertical transmission in Balb/c mice infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 129, 159–164.
- Kasper LH, Khan IA (1998). Antigen-specific CD8+T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect Immun* 66, 1554–1560.
- Khan LA, Matsuura T, Kasper LH (1995). IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunol* 17, 185–195.
- Khan LA, Schwartzman JD, Fonseca S, Kasper LH (1997). *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp Parasitol* 85, 24–34.
- Killick-Kendrick R (1979). Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In “Biology of the Kinetoplastida”, eds Lumsden WHR e Evans DA, Academic Press, London, UK.
- Killick-Kendrick R (1986). The transmission of Leishmaniasis by the bite of the sandfly. *J R Army Med Corps* 312, 134–140.
- Kirman JR, Seder RA (2003). DNA vaccination: the answer to stable, protective T-cell memory? *Curr Opin Immunol* 15, 471–476.
- Klabunde J, Uhlemann AC, Tebo AE, Kimmel J, Schwarz RT, Kremsner PG, Kun JF (2002). Recognition of *Plasmodium falciparum* proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. *Parasitol Res* 88, 113–117.
- Klion AD, Nutman TB (2004). The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol* 113, 30–37.
- Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R (1997). Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 7, 861–871.
- Korbel DS, Finney OC, Riley EM (2001). Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol* 34, 1517–1528.
- Krebs DL, Hilton DJ (2001). SOCS proteins: Negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19, 378–387.
- Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic M (1996). Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol* 156, 644–652.

- Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, Woods AS, Gowda DC (2005). Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 280, 8606–8616.
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I (2004). Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 72, 1920–1928.
- Kumar S, Jack R (2006). Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells. *J Endotoxin Res* 12, 278–284.
- Kyaw T, Suwimonterabutr J, Virakul P, Lohachit C, Kalpravidh W (2005). Seronegative conversion in four *Neospora caninum* infected cows, with a low rate of transplacental transmission. *Vet Parasitol* 131, 145–150.
- Lainson R, Shaw JJ (1988). Observation on the development of *Leishmania* (L.) *chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann Parasitol Hum Comp* 63, 134–145.
- Lambert H, Hitziger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A (2006). Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol* 8, 1611–1623.
- Langermans JAM, Van der Hulst MEB, Nibbering PH, Hiemstra PS, Fransen L, Van Furth R (1992). IFN-induced L-arginine-dependent *Toxoplasma* static activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor. *J Immunol* 148, 568–574.
- Laskay T, Rollinghoff M, Solbach W (1993). Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur J Immunol* 23, 2237–2241.
- Laskay T, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W (1995). Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 25, 2220–2227.
- Laurenti MD, Gidlund M, Ura DM, Sinhorini IL, Corbett CE, Goto H (1999). The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous Leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 32, 323–325.
- Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P (2001). Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 79, 273–284.
- Leav BA, Yoshida M, Rogers K, Cohen S, Godiwala N, Blumberg RS, Ward H (2005). An early intestinal mucosal source of gamma interferon is associated with resistance to and control of *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infect Immun* 73, 8425–8428.
- Lee MS, Kim YJ (2007). Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells* 23, 1–10.
- Lewis DJ (1975). Functional morphology of the mouth parts in New World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Trans R Entomol Soc London* 126, 497–532.

- Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L (1997). Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B* 352, 1311-1315.
- Lightowlers MW (2006). Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology* 133, Suppl:S27-S42.
- Lindsay DS, Dubey JP (1990). Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J Parasitol* 76, 177-179.
- Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP (1990b). Infection of mice with *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) does not protect against challenge with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 58, 2699-2700.
- Lindsay DS, Lenz SD, Cole RA, Dubey JP, Blagburn BL (1995). Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J Parasitol* 81, 313-315.
- Lindsay DS, Lenz SD, Dykstra CC, Blagburn BL, Dubey JP (1998). Vaccination of mice with *Neospora caninum*: response to oral challenge with *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* 84, 311-315.
- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB (1999a). Confirmation that the dog is definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 82, 327-333.
- Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP (1999b). A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int J Parasitol* 29, 1521-1523.
- Lipoldová M, Demant P (2006). Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of Leishmaniasis. *Nat Rev Genet* 7, 294-305.
- Liu CH, Fan YT, Dias A, Esper L, Corn RA, Bafica A, Machado FS, Aliberti J (2006). Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol* 177, 31-35.
- Long CA (1993). Immunity to blood stages of malaria. *Curr Opin Immunol* 5, 548-556.
- Long MT, Baszler TV, Mathison BA (1998). Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J Parasitol* 84, 316-324.
- Long MT, Baszler TV (2000). Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *J Immunol* 164, 4768-4774.
- Longstaffe JA, Guy MW (1986). Canine Leishmaniasis: United Kingdom update. *J Small Anim Pract* 27, 663-667.
- López R, Lucena R, Novales M, Ginel PJ, Martín E, Molleda JM (1996). Circulating immune complexes and renal function in canine Leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B* 43, 469-474.
- Lucena R, Molleda JM, Ginel PJ, Novales M, Martín E, López R (1994). Third component of complement serum levels in dogs with Leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed A* 41, 48-52.
- Lüder CG, Seeber F (2001). *Toxoplasma gondii* and MHC-restricted antigen presentation: on degradation, transport and modulation. *Int J Parasitol* 31, 1355-1369.

- Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS (1984). Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 252, 913–917.
- Lunden A, Marks J, Maley S, Innes EA (1998). Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol* 20, 519–526.
- Luty AJ, Kun JF, Kremsner PG (1998). Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 178, 1221–1224.
- Lutz MB, Rovere P, Kleijmeer MJ, Rescigno M, Assmann CU, Oorschot VM, Geuze HJ, Trucy j, Demandolx D, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P (1997). Intracellular routes and selective retention of antigens in mildly acidic cathepsin D/lysosome-associated membrane protein-1/MHC class II-positive vesicles in immature dendritic cells. *J Immunol* 159, 3707–3716.
- Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A, Akuffo H (1998). Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous Leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect Immun* 66, 2698–2704.
- Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, Innes E (2004). Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J Comp Pathol* 131, 142–156.
- Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+T cells. *J Immunol* 154, 5071–5079.
- Macura N, Zhang T, Casadevall A (2007). Dependence of macrophage phagocytic efficacy on antibody concentration. *Infect Immun* 75, 1904–1915.
- Madison MN, Kleshchenko YY, Nde PN, Simmons KJ, Lima MF, Villalta F (2007). Human defensin alpha-1 causes *Trypanosoma cruzi* membrane pore formation and induces DNA fragmentation, which leads to trypanosome destruction. *Infect Immun* 75, 4780–4791.
- Maia C, Rolão N, Nunes M, Gonçalves L, Campino L (2007). Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Trop* 103, 150–155.
- Maizels RM, Bundy DAP, Selkirk ME (1993). Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365, 797–805.
- Makni S, Ayed K, Ben Said M, Ben Rachid MS (1989). Study of circulating immune complexes during the evolution of visceral Mediterranean Leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 83, 349–355.
- Maley S, Buxton D, Macaldowie C, Anderson I, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Hamilton C, Storset A, Innes E (2006). Characterization of the immune response generated in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J Comp Pathol* 135, 130–141.
- Mancianti F, Poli A, Bionda A (1989). Analysis of renal immune-deposits in canine Leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia* 31, 213–230.
- Marks J, Lunden A, Harkins D, Innes E (1998). Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunol* 20, 303–309.

- Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Hernández S (1995). Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine Leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 48, 209–220.
- Marzochi MC, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi G, Momen H, Pacheco RS, Sabroza PC, De Souza MA, Rangel FB, Tramontano NC (1985). Canine visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem I Oswaldo Cruz* 80, 349-357.
- McAllister MM, McGuire AM, Jolley WR, Lindsay DS, Trees AJ, Stobart RH (1996). Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet Pathol* 33, 647-655.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 28, 1473-1478.
- McDowell MA, Marovich M, Lira R, Braun M, Sacks D (2002). *Leishmania* priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. *Infect Immun* 70, 3994–4001.
- McInnes IB, Gracie JA, Harnett M, Harnett W, Liew FY (2003). New strategies to control inflammatory synovitis: interleukin 15 and beyond. *Ann Rheum Dis* 62, 51-54.
- Miller HR (1990). Immunity to internal parasites. *Rev Sci Tech.* 9, 301-344.
- Molyneux DH, Ashford RW (1983). The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, Parasites of Man and Animals. London, Taylor and Francis.
- Mosser DM, Edelson PJ (1984). Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J Immunol* 132, 1501-1505.
- Mougneau E, Altare F, Wakil AE, Zheng S, Coppola T, Wang ZE, Waldmann R, Locksley RM, Glaichenhaus N (1995). Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* 268, 563-566.
- Mun HS, Aosai F, Norose K, Chen M, Piao LX, Takeuchi O, Akira S, Ishikura H, Yano A (2002). TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int Immunol* 15, 1081-1087.
- Muraille E, De Trez C, Brait M, De Baetselier P, Leo O, Carlier Y (2003). Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized TH2 response. *J Immunol* 170, 4237–4241.
- Nagasawa H, Himeno K, Suzuki N (1996). Mini review: protective immunity in toxoplasmosis. *Appl Parasitol* 37, 284-292.
- Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA, Cotter RJ, Costello CE, Ockenhouse CF, Davidson EA, Gowda DC (2000). Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med* 192, 1563–1576.
- Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Ridondo E (1992). Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 45, 33-47.
- Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I (1999). Analysis of the humoral immune response against total and

- recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental Leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67, 117-130.
- Nishikawa Y, Inoue N, Xuan X, Nagasawa H, Igarasha I, Fujisaka K, Otsuka H, Mikami T (2001a). Protective vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. *Vaccine* 19, 1381-1390.
 - Nylén S, Sacks D (2007). Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral Leishmaniasis. *Trends Immunol* 28, 378-84.
 - O'Garra A, Hosken N, Macatonia S, Wenner CA, Murphy K (1995). The role of macrophage- and dendritic cell-derived IL-12 in Th1 phenotype development. *Res Immunol* 146, 466-472.
 - O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG (2003). The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 24, 286-290.
 - O'Doherty U, Ignatius R, Bhardwaj N, Pope M (1997). Generation of monocyte-derived dendritic cells from precursors in rhesus macaque blood. *J Immunol Methods* 207, 185-194.
 - Osburn BI, MacLachlan NJ, Terrell TG. (1982). Ontogeny of the immune system. *JAVMA* 181, 1049-1052.
 - Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, Thieblemont N, Jeannin P (2002). The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol* 168, 6366-6374.
 - Ouaisi MA (1988). Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitol Today* 4, 169-173.
 - Paillot R, Laval F, Audonnet JC, Andreoni C, Juillard V (2001). Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology* 102, 396-404.
 - Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA (2007). Building an immune system from nine domains. *Biochem Soc Trans* 35, 1437-1444.
 - Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Mitolo V, Sisto M, Fasanella A, Trotta T, Bertani F, Consenti B, Brandonisio O (2001). Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 24, 187-195.
 - Papazahariadou M, Athanasiadis GI, Papadopoulos E, Symeonidou I, Hatzistilianou M, Castellani ML, Bhattacharya K, Shanmugham LN, Conti P, Frydas S (2007). Involvement of NK cells against tumors and parasites. *Int J Biol Markers* 22, 144-153.
 - Pare J, Thurmond MC, Hietala SK (1997). *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol* 83, 82-87.
 - Patel SN, Lu Z, Ayi K, Serghides L, Gowda DC, Kain KC (2007). Disruption of CD36 impairs cytokine response to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria in vivo. *J Immunol* 178, 3954-3961.
 - Pearson RD, Jeronimo SMB, Sousa A de Q (2001). Leishmaniasis. In *Principles and Practice of Clinical Parasitology*, Ed. Gillespie S e Pearson RD, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK.

- Persechino A, Oliva G (1986). Autoimmunity associated with Leishmaniasis in dogs. *Acta Med Vet (Napoli)* 32, 117-124.
- Peters M, Lütkefels E, Heckerroth AR, Schares G (2001). Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol* 31, 1144–1148.
- Pied S, Nussler A, Pontent M, Miltgen F, Matile H, Lambert PH, Mazier D (1989). C-reactive protein protects against preerythrocytic stages of malaria. *Infect Immun* 57, 278–282.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernardina W, Del Real G, Ruitenbergh J (1994). Cellular and humoral responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62, 229–235.
- Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJP, Rutten VP, Gebhard D, del Real G, Ruitenbergh EJ (1995). *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol* 25, 1594–1600.
- Pinelli E, van der Kaaij SY, Slappendel R, Fragio C, Ruitenbergh EJ, Bernadina W, Rutten VP (1999). Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 69, 121–126.
- Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenbergh EJ, Rutten VP (2000). Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-Leishmanial activity. *Vet Parasitol* 92, 181-189.
- Pinheiro PHC, Dias SS, Eulálio KD, Mendonça IL, Katz S, Barbiéri CL (2005). Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. *Infect Immun* 73, 3787–3789.
- Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L (1991). Canine Leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Pathol* 105, 279-286.
- Quinn HE, Ellis JT, Smith NC (2002). *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol* 18, 391–394.
- Quinn HE, Miller CM, Ellis JT (2004). The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. *Int J Parasitol* 34, 723–732.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM (2001). Tissue cytokine responses in canine visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis* 183, 1421–1424.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ (2003). IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral Leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 91, 161–168.
- Rafati S, Nakhaee A, Taheri T, Taslimi Y, Darabi H, Eravani D, Sanos S, Kaye P, Taghikhani M, Jamshidi S, Rad MA (2005). Protective vaccination against experimental canine visceral Leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 23, 3716–3725.
- Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA, Larraga V (2003). Protection in dogs against visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization

- with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21, 2474–2484.
- Reid SD, Penna G, Adorini L (2000). The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 12 114-121.
 - Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186, 1819-1829.
 - Reis e Sousa C, Yap G, Schulz O, Rogers N, Schito M, Aliberti J, Hieny S, Sher A (1999). Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity* 11, 637–647.
 - Relloso M, Puig-Kröger A, Pello OM, Rodríguez-Fernández JL, de la Rosa G, Longo N, Navarro J, Muñoz-Fernández MA, Sánchez-Mateos P, Corbí AL (2002). DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and antiinflammatory agents. *J Immunol* 168, 2634–2643.
 - Rettigner C, De Meerschman F, Focant C, Vanderplasschen A, Losson B (2004). The vertical transmission following the reactivation of a *Neospora caninum* chronic infection does not seem to be due to an alteration of the systemic immune response in pregnant CBA/Ca mice. *Parasitology* 128, 149–160.
 - Ribeiro-Gomes FL, Silva MT, Dosreis GA (2006). Neutrophils, apoptosis and phagocytic clearance: an innate sequence of cellular responses regulating intramacrophagic parasite infections. *Parasitology* 132, 61-68.
 - Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MC, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, Lungarella G, DosReis GA (2007). Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol* 179, 3988-3994.
 - Ridley DS (1979). The pathogenesis of cutaneous Leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73, 150-160.
 - Ridley MJ, Ridley DS (1984). Cutaneous Leishmaniasis: immune complex formation and necrosis in the acute phase. *Br J Exp Pathol* 65, 327-336.
 - Rioux JA, Aboulker JP, Lanotte G, Killick-Kendrick R, Martini-Dumas A (1985). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 21. Influence de la temperature sur le developpement de *Leishmania infantum* Nicolle 1908, chez *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Etude experimentale. *Ann Parasitol Hum Comp* 60, 221-229.
 - Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9577-9582.
 - Rockett KA, Auburn MM, Rockett AJ, Cowden WB, Clark IA (1994). Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite Immunol* 16, 243-249.
 - Rosbottom A, Guy CS, Gibney EH, Smith RF, Valarcher JF, Taylor G, Williams D (2007). Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol* 29, 219–228.
 - Rossol M, Meusch U, Pierer M, Kaltenhäuser S, Häntzschel H, Hauschildt S, Wagner U (2007). Interaction between transmembrane TNF and TNFR1/2

- mediates the activation of monocytes by contact with T cells. *J Immunol* 179, 4239-4248.
- Rousseau D, Demartino S, Ferrua B, Michiels JF, Anjuère F, Fragaki K, Le Fichoux Y, Kubar J (2001). In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol* 1, 17-23.
 - Sacchi L, Bandi C (2004). Biologia dei parassiti. In “De Carneri – Parassitologia generale e umana, eds. Genchi C, Pozio E, CEA, Milano.
 - Sacchi L, Calvi LE, Kramer LH, Ferroglio E, Grandi G, Clementi E, Corona S (2006). Antigen-specific maturation of canine dendritic cells with up-regulation of MHCII synthesis and expression. *J Comp Path* 135, 17-24.
 - Sacks D, Sher A (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 3, 1041-1047.
 - Sahl HG, Pag U, Bonness S, Wagner S, Antcheva N, Tossi A (2005). Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J Leukoc Biol* 77, 466-475.
 - Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H (2002). Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 88, 21–30.
 - Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J (1995). Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 63, 4894–4899.
 - Scanga C, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, Medzhitov R, Sher A (2002). Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol* 168, 5997-6001.
 - Schares G, Heydorn AO, Cuppers A, Conraths FJ, Mehlhorn H (2001). *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. *Parasitol Res* 87, 808-816.
 - Scharton-Kersten T, Scott P (1995). The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *J Leukoc Biol* 57, 515–522.
 - Scharton-Kersten TM, Sher A (1997). Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 9, 44-51.
 - Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC (2007). Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 120, 1279-1284.
 - Schmid D, Denjel J, Schoor O, Stevanovic S, Munz C (2006). Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med* 84, 194-202.
 - Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham S, Sher A, Reis e Sousa C (2000). CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13, 453-462.
 - Scott P, Hunter CA (2002). Dendritic cells and immunity to Leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol* 14, 466-470.

- Sher A, Collazzo C, Scanga C, Jankovic D, Yap G, Aliberti J (2003). Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunol Res* 27, 521-528.
- Shortman K, Liu YJ (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Immunol Rev* 21, 151-161.
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L (2000). The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90, 37-45.
- Soulsby EJJ (editor) (1987). Immune responses in parasitic infections: immunology, immunopathology, and prophylaxis. 4 volumi, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Sousa A de Q, Parise ME, Pompeu MML, Coehlo Filho JM, Vasconcelos IAB, Lima JWO, Oliveira EG, Vasconcelos AW, David JR, Maguire JH (1995). Bubonic Leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 53, 380-385.
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model of their trafficking properties. *J Immunol* 161, 1083-1086.
- Stäger S, Alexander J, Carter KC, Brombacher F, Kaye PM (2003). Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal anti-*Leishmania* activity. *Infect Immun* 71, 4804-4807.
- Stanley AC, Engwerda CR (2007). Balancing immunity and pathology in visceral Leishmaniasis. *Immunol Cell Biol* 85, 138-147.
- Staska LM, McGuire TC, Davies CJ, Lewin HA, Baszler TV. (2003). *Neospora caninum* infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun* 71, 3272-3279.
- Staska LM, Davies CJ, Brown WC, McGuire TC, Suarez CE, Park JY, Mathison BA, Abbott JR, Baszler TV (2005). Identification of vaccine candidate peptides in the NcSRS2 surface protein of *Neospora caninum* by using CD4+ cytotoxic T lymphocytes and gamma interferon-secreting T lymphocytes of infected holstein cattle. *Infect Immun* 73, 1321-1329.
- Steinman R (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296.
- Steinman RM, Hemmi H (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311, 17-58.
- Steinman RM, Banchereau J (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449, 419-426.
- Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Uggla A, Björkman C (1999). Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 85, 227-234.
- Strauss-Ayali D, Baneth G, Shor S, Okano F, Jaffe CL (2005). Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Int J Parasitol* 35, 63-73.

- Swenson CL, Silverman J, Stromberg PC, Johnson SE, Wilkie DA, Eaton KA, Kociba GJ (1988). Visceral Leishmaniasis in an English foxhound from an Ohio research colony. *JAVMA* 193, 1089-1092.
- Tafuri WL, Rosa De Oliveira M, Melo NM, Tafuri WL (2001). Canine visceral Leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol* 96, 203-212.
- Takeuchi O, Akira S (2002). MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 270, 155-167.
- Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC (1997). Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J Vet Diagn Invest* 9, 44-49.
- Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC (1999). Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. *J Vet Diagn Invest* 11, 90-94.
- Titus RG, Sherry B, Cerami A (1991). The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunol Today* 12, 13-16.
- Tizard I (2004). *Veterinary immunology – an introduction*. VII Editon, Saunders-Elsevier, Philadelphia, USA.
- Trees AJ, McAllister MM, Guy CS, McGarry JW, Smith RF, Williams D (2002). *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet Parasitol* 109, 147-154.
- Trinchieri G (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.
- Tryphonas L, Zawadzka Z, Bernard MA, Janzen EA (1977). Visceral Leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Can J Comp Med* 41, 1-12.
- Turco SJ (1988). The lipophosphoglycan. *Parasitol Today* 4, 255-257.
- Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steiman RM, Mellman I (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288, 522-527.
- Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 5, 102-110.
- Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M (2000). Masticatory and skeletal muscle myositis in canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec* 146, 698-703.
- Vandenabeele S, Wu L (1999). Dendritic cell origins: puzzles and paradoxes. *Immunol Cell Biol* 77, 411-419.
- Vianna VL, Takiya CM, Brito-Gitirana L (2002). Histopathological analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. *Parasitol Res* 88, 829-836.
- Viñuelas J, García-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Miron C, Carcelen J, Alonso C, Nieto CG (2001). Meningeal leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 101, 23-27.
- Warren KS (editor) (1993). *Immunology and molecular biology of parasitic infections*. 4th edition, Blackwell, Boston, USA.

- Wellman ML, Krakowka S, Jacobs RM, Kociba GJ (1988) A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. *In Vitro Cell Dev Biol* 24, 223-229.
- White AC Jr, Robinson P, Kuhn R (1997). *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem Immunol* 66, 209-230.
- Wijewardana V, Sugiura K, Oichi T, Fujimoto M, Akazawa T, Hatoya S, Inaba M, Ikehara S, Jayaveera TSP, Inaba T (2006). Generation of canine dendritic cells from peripheral blood monocytes without using purified cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 114, 37-48.
- Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, MacEachern K, Cripps PJ, Kelly DF, Trees AJ (2000). *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121, 347-358.
- Wilson ME, Innes DJ, Sousa AQ, Pearson RD (1987). Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. *J Parasitol* 73, 55-63.
- Wilson ME, Pearson RD (1988). Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 56, 363-369.
- Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, Waisman A, Nigg AP, Knop J, Udey MC, von Stebut E (2006). Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* 203, 177-188.
- Wouda W, Moen AR, Visser IJR, van Knapen F (1997). Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J Vet Diagn Invest* 9, 180-185.
- Yamane I, Kitani H, Kokuho T, Shibahara T, Haritani M, Hamaoka T, Shimizu S, Koiwai M, Shimura K, Yokomizo Y (2000). The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *J Vet Med Sci* 62, 347-351.
- Yao V, Platell c, Hall J C (2002). Dendritic cells. *ANZ J Surg* 72, 501-506.
- Yap G, Pesin M, Sher A (2000). Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 165, 628-631.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-1629.