

Sommario

Background

Le leishmaniosi sono un gruppo di malattie parassitarie, comprendenti una forma viscerale (VL) che colpisce gli organi interni, fatale se non trattata, una grave forma muco-cutanea (MCL), che può portare a mutilazione delle mucose di naso, bocca e gola e una forma cutanea (CL) più lieve, che può guarire anche senza cure. La VL è un grave problema in molte zone del mondo, soprattutto a clima tropicale e subtropicale; i farmaci attuali possono dare effetti collaterali di tossicità, nonché generare fenomeni di resistenza, per cui è costante la ricerca di nuovi composti e l'individuazione di nuovi "drug target". In questa tesi ho voluto approfondire la patologia sia dal punto di vista biochimico che da quello clinico. Lo studio biochimico consta di due parti. La prima è l'analisi dell'effetto antiproliferativo dell'analogo della nicotinamide, 6-AN, sul parassita *Leishmania*, e degli effetti sul suo metabolismo mediante la tecnica dell'analisi metabolomica. Il rationale dello studio è che essendo riportato che il bersaglio principale della 6-AN è la via dei pentosi fosfato (PPP), via metabolica necessaria al sistema di difesa antiossidante della cellula e i cui enzimi in questa famiglia di parassiti, presentano differenze significative con quelli di mammifero, la stessa via potrebbe rappresentare un buon bersaglio di farmaci leishmanicidi. Un secondo potenziale bersaglio potrebbe essere l'enzima transglutaminasi (TGase), catalizzante la formazione di legami isopeptidici intra- e inter-molecolari, resistenti alla proteolisi. In alcune specie di *Leishmania* ne è stata identificata l'attività, la cui inibizione si è dimostrata dannosa per il parassita. Perciò la seconda parte dello studio biochimico ha riguardato la sua ricerca e caratterizzazione in *L. infantum*, allo scopo di tentarne la purificazione, importante per il successivo clonaggio. Nello studio clinico della tesi, si è valutata la prevalenza di parassitosi da *Leishmania*, asintomatiche/subcliniche, mediante tecniche molecolari, in pazienti affetti da patologie reumatiche autoimmuni, trattati con farmaci biologici, immunosoppressori (anticorpi anti-TNF- α , modulatori dell'attività di linfociti T o anticorpi anti-recettore di IL-6) correlandola con l'analisi di specifiche citochine. È stata anche fatta una correlazione con la zona di residenza, considerando che in Italia la zona di endemicità si sta espandendo.

Metodologia

Nello studio con 6-AN, promastigoti dei ceppi di *L. mexicana* M379 e di *L. infantum* PCM5 sono stati trattati per 24 ore con 6-AN 7,8 mM e DMSO 2.17%. Oltre alla vitalità è stata anche studiata l'infettività dei promastigoti trattati con 6-AN, su macrofagi murini e l'effetto combinato di 6-AN e agenti ossidanti. Dopo estrazione, i metaboliti più piccoli sono stati analizzati mediante pHILIC-LC-MS, in modalità "polarity switching mode", i dati sono stati ulteriormente analizzati mediante IDEOMv19 e MetaboAnalyst 3.0.

Nello studio sulla TGase, l'attività è stata saggiata *in vivo* in promastigoti di un ceppo canino di *L. infantum*, dopo incubazione con fluoresceina-cadaverina (FC). Strisci sono stati fissati e lavati con metanolo a -20°C per 15 minuti e l'incorporazione di FC è stata analizzata con microscopio a fluorescenza Nikon Microphot FXA. In altri esperimenti il lisato cellulare è stato incubato per 1 ora a 30°C con FC 4 mM, in presenza o assenza di dimetil-caseina e la fluorescenza visualizzata su gel, dopo SDS-PAGE, con Molecular Imager Pharos FX imaging system (Bio-Rad). L'attività enzimatica è stata anche saggiata in micropiastra col TGase activity assay Kit (Sigma) sia sul lisato cellulare che dopo frazionamento con solfato d'ammonio (AS). Anticorpi policlonali contro TGase 2 umana (pAbs, orb2986) e anticorpi secondari coniugati con FITC sono stati utilizzati nell'analisi immunocitochimica di *L. infantum* canina mentre anticorpi secondari HRP-coniugati sono stati utilizzati per Western Blot con lisati cellulari di *L. infantum* sia canina che umana e frazioni proteiche ottenute dal ceppo canino dopo precipitazione con AS 15 e 45%, visualizzati col sistema ECL.

Nello studio clinico si sono utilizzate PCR qualitativa e real-time, specifiche per *Leishmania*, su DNA estratti da PBMC di 50 pazienti affetti da patologie reumatiche autoimmuni (artrite reumatoide, RA, spondilite anchilosante, AS, e artrite psoriasica, PsA) trattati con farmaci immunosoppressori per almeno 5 anni. Come controlli negativi si sono utilizzati DNA estratti da 50 soggetti sani mentre come controllo positivo il DNA estratto da *L. infantum*. Ulteriormente si sono quantificate le citochine seriche sia nei pazienti con DNA positivo e negativo per *Leishmania* che nel gruppo di controllo.

Risultati

Sia in *L. mexicana* che in *L. infantum*, 6-AN ha causato una diminuzione significativa di fosforibosil-pirofosfato (PRPP) e nicotinato (Na) e, come

conseguenza, di nucleotidi purinici e pirimidinici mentre le nucleobasi sono aumentate. I livelli di glutatione, ribosio-5-fosfato, 6-fosfogluconato e intermedi PPP a valle erano simili ai controlli non trattati. Solo con *L. infantum* si è riusciti ad analizzare NAD⁺ e NADPH, che insieme all'intermedio PPP D-sedoepulosio 7-fosfato, sono stati trovati diminuiti. 6-AN ha inoltre causato un allungamento marcato del corpo cellulare del parassita. Sembra che l'effetto anti-proliferativo di 6-AN sia additivo con gli agenti ossidanti utilizzati mentre non abbia influenza sull'infettività dei macrofagi.

Si è confermato che *L. infantum* possiede attività TGAsica, ne è stata rivelata l'attività in promastigoti sia del ceppo umano che di quello canino. Infatti, incubati in coltura con FC, essi hanno presentato fluorescenza verde intracellulare, su sfondo chiaro non fluorescente. Inoltre, dopo incubazione dei lisati cellulari con FC +/- dimetilcaseina e SDS-PAGE, è stato possibile rivelare bande fluorescenti corrispondenti sia alla dimetilcaseina che a substrati endogeni. Dopo precipitazione con AS due frazioni hanno mostrato attività: 15 e 45%, quest'ultima ha rivelato, mediante saggio su micropiastra, attività Ca²⁺-dipendente e inibita da GTP 10mM. In aggiunta, si è evidenziata fluorescenza mediante analisi immunocitochimica e l'Western Blot trattato con gli stessi anticorpi ha mostrato una banda di 74.6 KDa per il ceppo canino e due per il ceppo umano, di 55.34 KDa e 65.87 KDa rispettivamente.

Mediante PCR convenzionale e/o quantitativa, è stata riscontrata positività per il DNA di *Leishmania* in 18 dei 50 (36%) pazienti con patologie reumatiche autoimmuni analizzati, con reperimento di un'alta carica parassitaria (1-136 parassiti/ml in 4 pazienti, 1.000- 40.000 in 11 pazienti e > 1.000.000 in 3 pazienti). I pazienti in trattamento sia con steroidi che con farmaci biologici hanno mostrato una più alta positività per kDNA di *L. infantum* rispetto a quelli trattati solo con farmaci biologici (p<0.05). Non si sono evidenziate invece significative differenze tra possessori o meno di cani, e in riferimento al tipo di farmaco biologico somministrato. Rispetto ai soggetti sani, in tutti i pazienti reumatologici autoimmuni in trattamento con farmaci immunosoppressori, erano significativamente elevate le citochine pro-infiammatorie IL-1, IL-6, IL-12(p70), IL-7, IL-15, IFN- γ e TNF- α , quelle anti- infiammatorie IL-4 e IL-13 e la regolatoria IL-10, ma un aumento maggiore era presente nei pazienti positivi per la presenza di DNA di *Leishmania*.

Conclusioni

Nei mammiferi la 6-AN è metabolizzata, da una NAD⁺ glicoidrolasi, a 6-ANAD/P, responsabile della sua tossicità; in *Leishmania* la tossicità è presente solo in concentrazione millimolare e porta, verosimilmente tramite la via metabolica Preiss-Handler, di sintesi del NAD⁺, a deplezione del contenuto cellulare di PRPP, che causa a sua volta il depauperamento in nucleotidi necessario alla biosintesi degli acidi nucleici. Il marcato allungamento del corpo cellulare dei parassiti trattati con 6-AN, ricorda proprio la sofferenza (starvation) indotta da deprivazione di nucleotidi. In *Leishmania* la NAD⁺ glicoidrolasi probabilmente idrolizza il NAD⁺ ma non catalizza lo scambio tra nicotinamide e 6-AN, come avviene anche in altri microrganismi. Futuri studi con analisi di flusso dopo marcatura con ¹³C-glucosio potrebbero chiarire destino metabolico e meccanismo d'azione del 6-AN in *Leishmania*. Dai risultati ottenuti salta all'occhio come la PRPP sintetasi potrebbe essere un buon "target" per nuovi potenziali farmaci per le leishmaniosi, data l'inibizione della crescita provocata dalla massiva deplezione in PRPP.

Si è rivelata *in vivo* and *in vitro*, una transamidazione, che conferma la presenza in *Leishmania* di una TGase attiva, dimostratasi Ca²⁺-dipendente in promastigoti di *L. infantum* canina, e inibita da GTP. La precipitazione della proteina a basse saturazioni di AS (15%) suggerisce che l'enzima potrebbe essere associato alla membrana. Ulteriormente, l'identificazione, tramite gli anticorpi pAbs (orb2986) contro TGase, di bande specifiche in Western blot e, in cellule, di marcatura localizzata, suggerisce che questi anticorpi potrebbero essere utili alla purificazione dell'enzima, mediante cromatografia d'affinità.

L'alta parassitemia da *Leishmania* trovata nelle frazioni PBMC preparate da sangue di pazienti affetti da patologie reumatiche autoimmuni trattati con farmaci biologici, suggerisce che il trattamento con questi farmaci immunosoppressivi possa portare a VL criptica cioè infezione latente, con possibilità di progressione a VL conclamata nel caso il quadro si evolva in uno stato di immunocompromissione. L'assunzione di farmaci steroidei in aggiunta ai biologici è risultata significativamente associata a una maggior positività per *L. infantum* kDNA. I dati suggeriscono che, prima di somministrare questo tipo di farmaci a pazienti con patologie autoimmuni, si potrebbero introdurre uno screening molecolare su frazioni PBMC, facilmente ottenibili, e l'analisi di citochine. Inoltre l'estensione della ricerca ad aree rurali e suburbane sarebbe utile alla mappatura

della distribuzione di ceppi di *Leishmania*, in grado di provocare infezione nell'uomo.