



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Dottorato di Ricerca in “Scienze veterinarie”

Coordinatore: Prof. Adriana Ferlazzo

Curriculum: Morfofisiologia e Biotecnologie applicate

**Studio comparato di profili di espressione in risposte
biochimiche e biomolecolari all'esposizione a *Toxoplasma
gondii* in varie specie animali**

Tesi di Dottorato di:
dott.ssa Annamaria Castello

Annamaria Castello

Tutor:
Ch.ma Prof.ssa Alida Ferlazzo

Alida Ferlazzo

Co-Tutor:
**Ch.ma Dott.ssa Anna Maria Fausta
Marino**

Anna Maria Fausta Marino

INDICE

Riassunto	3
1 Introduzione	5
1.1 Toxoplasmosi, definizione e descrizione dell'infezione	5
1.1.1 Aplogruppi e distribuzione geografica	5
1.2 Diagnosi dell'infezione	8
1.2.1 Metodi sierologici	8
1.2.2 Tecniche di biologia molecolare, <i>Real-time PCR</i> e <i>Nested PCR</i>	10
1.3 <i>Toxoplasma gondii</i>	11
1.3.1 Generalità	11
1.3.2 Ciclo vitale	14
1.4 Ospiti	15
1.4.1 Ospite definitivo	15
1.4.2 Ospiti intermedi	16
1.4.3 Sieroprevalenza	16
1.4.4 Sintomatologia	17
1.4.5 Risposta immunitaria ed Ipobiosi	18
1.4.6 Alterazioni comportamentali e possibili spiegazioni	20
1.4.7 Serotonina circolante ed immuno-modulazione	22
1.4.8 Molecole-chiave delle risposte cellulari dell'ospite e toxoplasmosi	26
2 Scopo del lavoro	32
3 Materiali e Metodi	34
3.1 Determinazione della positività o negatività all'infezione da <i>Toxoplasma gondii</i> mediante ricerca indiretta di anticorpi specifici nel siero	35

3.2	Determinazione della contaminazione dei tessuti d'elezione da cisti di <i>Toxoplasma gondii</i>, mediante ricerca diretta del DNA del parassita	37
3.2.1	Estrazione del DNA	38
3.2.2	<i>Real-time PCR</i>	38
3.3	Emocromo e valutazione di parametri ematochimici in animali positivi e negativi all'infezione	41
3.4	Determinazione della concentrazione di serotonina nel plasma di animali positivi e negativi all'infezione	42
3.5	Analisi dei profili d'espressione di proteine chiave delle risposte immunitarie o ipoteticamente correlate alla toxoplasmosi in animali positivi e negativi all'infezione	44
3.5.1	Progettazione dei <i>primers</i>	45
3.5.2	Prelievo, preparazione e conservazione dei campioni	45
3.5.3	Estrazione dell'RNA	47
3.5.4	Retrotrascrizione in cDNA e <i>Real-time PCR</i>	48
4	Risultati	53
4.1	Parametri ematochimici e concentrazione di serotonina plasmatica	53
4.2	Profili d'espressione	58
4.2.1	HIF1 α e PHD2	60
4.2.2	PTEN, PI3K ed AKT1	64
4.2.3	MEK3	67
4.2.4	NOD2	68
5	Conclusioni	71
	Bibliografia	76

RIASSUNTO

Toxoplasma gondii è un protozoo diffuso a livello globale, che causa una zoonosi di origine alimentare tra le più comuni in Europa. Oltre a determinare perdite economiche considerevoli per gli allevatori, legate soprattutto ai casi di aborto, tale parassitosi rappresenta anche un fattore di rischio rilevante soprattutto per le donne in gravidanza ed i pazienti immunosoppressi. Inoltre diversi studi recenti hanno dimostrato o ipotizzato una correlazione tra la condizione latente ed asintomatica dell'infezione e diversi disturbi a carico del sistema nervoso. Nonostante ciò tale parassitosi risulta ancora sottostimata. Tutte le specie sono potenzialmente soggette a contrarre la Toxoplasmosi. Tuttavia il parassita attecchisce più facilmente in alcune specie, causando sintomi più severi rispetto ad altre meno sensibili, come quella equina. Considerando questa variabilità specie-specifica, tanto in termini di suscettibilità alla toxoplasmosi quanto di gravità dei sintomi associati, comprendere quali meccanismi neuroendocrini e molecolari dell'ospite vengono modulati dal parassita risulterebbe interessante sia in medicina umana che veterinaria. È possibile ipotizzare che le alterazioni a carico del sistema nervoso associate alla Toxoplasmosi siano in qualche modo riconducibili ad alterazioni a carico del sistema serotoninergico. Tuttavia mentre sono disponibili dati, seppur contrastanti, sulla variazione dei livelli di serotonina in alcuni tessuti target del parassita, non sono stati trovati in letteratura dati sui suoi livelli plasmatici. Diverse molecole si sono dimostrate in qualche modo collegate alle risposte cellulari a *T. gondii*, ma la maggior parte delle analisi di riferimento è stata eseguita su cellule in coltura o su modelli murini. Per questa ragione risulterebbe di particolare interesse riuscire a confermare tali dati in altre specie animali, infettate naturalmente dal parassita. Sulla base di tali osservazioni, l'obiettivo di questo progetto era quello di valutare la variazione della concentrazione plasmatica di serotonina e dei profili di espressione di alcune molecole di interesse tra animali infetti e non infetti (gruppo controllo) di varie specie animali. Sui campioni sottoposti alle analisi citate è stata effettuata la

valutazione di alcuni parametri ematologici generali, che hanno messo in evidenza quantità significativamente più elevate di alcuni elementi della linea cellulare bianca negli animali infetti rispetto ai gruppi controllo, con differenze specie-specifiche. I livelli di serotonina plasmatica sono stati valutati mediante saggio ELISA in 66 equini, 57 ovini e 43 bovini. Non è stata rilevata alcuna variazione significativa di tale parametro tra bovini infetti e sani, mentre sono risultati livelli significativamente più elevati negli ovini infetti rispetto al gruppo controllo, contrariamente a quanto osservato negli equini, nei quali sono stati determinati livelli di serotonina più elevati negli animali sani rispetto agli infetti. I profili di espressione sono stati valutati in alcuni tessuti *target* dell'infezione (tronco encefalico, diaframma ed intestino) di 11 equini, 10 ovini, 15 bovini e 15 suini. Mediante le analisi effettuate è stato possibile osservare alcune variazioni interessanti dei livelli di mRNA tra animali sani ed infetti, e differenze specie-specifiche tra i profili di espressione fisiologici. Analisi più approfondite potranno chiarire se queste variazioni si riflettono anche sui livelli delle proteine corrispondenti, in che modo possono essere influenzati i *pathways* molecolari a valle e di conseguenza i sistemi fisiologici o immunitari di risposta al parassita.

INTRODUZIONE

1.1 Toxoplasmosi, definizione e descrizione dell'infezione

La Toxoplasmosi è una zoonosi parassitaria diffusa tra le specie animali a sangue caldo e l'Uomo. Dopo il 1908, quando il parassita fu segnalato per la prima volta da un italiano, Alfonso Splendore, in un coniglio e quasi contemporaneamente (1909) isolato da Nicolle e Manceaux in un roditore africano (*Ctenodactylus gundi*) [Ajioka J.W., Morrissette N.S., 2009], esso è stato progressivamente riconosciuto come l'agente eziologico responsabile di un'infezione particolarmente diffusa tra gli animali. La rilevanza di tale parassitosi non solo in ambito veterinario ma anche per l'Uomo, fu compresa soltanto dopo l'individuazione dei primi casi di toxoplasmosi congenita [Schwartzman J. *et al.*, 1945]. Una comprensione completa del ciclo vitale del parassita fu raggiunta intorno agli anni '60, quando venne scoperto il ruolo centrale dei felini come ospiti definitivi di *T. gondii* [Frenkel J.K. *et al.*, 1970], mentre l'elevata incidenza dei casi di toxoplasmosi in pazienti immunosoppressi, registrata a partire dal 1970, mise in luce l'importanza del fenomeno della riattivazione dell'infezione. Nonostante la toxoplasmosi sia ancora sottostimata, essa presenta una diffusione mondiale e risulta tra le zoonosi di origine alimentare più diffuse in Europa [Report EFSA, 2016]. Oltre a causare perdite economiche considerevoli per gli allevatori, legate principalmente agli aborti, essa costituisce anche un fattore di rischio importante per l'Uomo, specie per le donne in gravidanza ed i soggetti immunosoppressi.

1.1.1 Aplogruppi e distribuzione geografica

L'estrema versatilità d'ospite di *T. gondii* ha comportato l'adattamento a diverse condizioni ambientali e l'evoluzione di un ciclo vitale particolarmente complesso, con l'alternanza di fasi di riproduzione asessuata in ospiti di diverse

specie e sessuata nell'intestino dei felini, nonché di diverse modalità di trasmissione, compresa quella alimentare. Una capacità di adattamento di tale portata è strettamente correlata ad un'ampia variabilità genetica del parassita, che ha comportato, inoltre, l'evoluzione di vari sierotipi, differenti tra loro per il grado di virulenza, i *patterns* epidemiologici di incidenza [Chen J. *et al.*, 2012] e la distribuzione geografica. Mediante studio di polimorfismi genetici, fino ad oggi sono stati individuati 12 aplogruppi, alcuni dei quali non risultano omogenei e comprendono sottogruppi differenti per distribuzione geografica e fenotipo. Inoltre fenomeni di ricombinazione sessuata tra linee clonali differenti hanno comportato un'evoluzione del parassita e generato ceppi di *T. gondii* atipici, caratterizzati da polimorfismi genetici unici, che non possono essere ricondotti a nessuno dei 12 gruppi individuati. Essi sono maggiormente virulenti [Montoya J.G., Liesenfeld O., 2004], vengono isolati principalmente in Africa ed in Sud America, raramente in Europa, e in genere soltanto in seguito al consumo di alimenti importati [Pomares C. *et al.*, 2011] o a periodi di residenza fuori dal territorio europeo. In Tabella 1.1 è riportata la distribuzione geografica degli aplogruppi principali ed il quadro sintomatico di infezione ad essi correlato riscontrabile nell'Uomo.

Tabella 1.1: Distribuzione geografica degli aplogruppi principali e quadro sintomatico di infezione riscontrabile nell’Uomo [Robert-Gagneux F., Dardé M.L., 2012].

Area geografica	Aplogruppo	Quadro sintomatico specifico
Europa	Tipo II (aplogruppo 2), predominante; Tipo III, maggiormente presente nel Sud Europa; Altri genotipi isolati sporadicamente.	Malattia asintomatica associata ai sierogruppi II e III in soggetti non immunocompromessi; Incidenza di retinocoroidite in soggetti immunocompetenti o affetti da toxoplasmosi congenita più bassa rispetto al Sud America.
Nord America	Tipo II (aplogruppo 2); Aplogruppo 12; Tipo III (aplogruppo 3).	Malattia asintomatica associata ai sierogruppi II e III in soggetti non immunocompromessi; Dati insufficienti sugli altri aplogruppi.
Sud/Centro America	Elevata diversità genotipica; Presenza di alcuni aplogruppi presenti anche in Africa (aplogruppo 6); Tipo II isolato sporadicamente; Tipo I raro; Presenza di genotipi atipici nella Foresta Amazzonica.	Maggiore incidenza e severità dei casi di retinocoroidite in soggetti immunocompetenti ed affetti da toxoplasmosi congenita; Casi potenzialmente letali, frequenti, associati ai genotipi maggiormente atipici.
Africa	Tipo africano 1, 2, 3 (aplogruppo 6); Tipo III (aplogruppo 3); Tipo II (aplogruppo 2).	Incidenza di casi di retinocoroidite maggiore che in Europa.
Asia	Varietà genotipica inferiore che in Sud America; Tipo III (aplogruppo 3) comunemente diffuso in tutto il Continente.	

La maggior parte dei ceppi isolati in Europa appartiene ai sierotipi II e III [Chen J. *et al.*, 2012], con una predominanza del Tipo II, il più diffuso tra pazienti affetti da AIDS. Il sierotipo III viene isolato meno frequentemente rispetto al Tipo II,

soprattutto nel Sud Europa e principalmente da animali, mentre il Tipo I viene isolato raramente, principalmente in soggetti affetti da toxoplasmosi congenita.

1.2 Diagnosi dell'infezione

La diagnosi di infezioni da *T. gondii* viene effettuata principalmente mediante metodi sierologici. Ad oggi sono stati sviluppati diversi saggi specifici, applicati per la diagnosi d'infezione in diverse specie animali, tuttavia i livelli di sensibilità e specificità dei metodi applicati varia in base alla specie considerata; inoltre i dati rilevati mediante saggi sierologici non forniscono informazioni sulla prevalenza di parassiti vitali. In alcuni casi sono stati isolati ceppi di *T. gondii* da animali sierologicamente negativi [Dubey J.P. *et al.*, 2002] e d'altra parte metodi di rilevazione diretta del parassita applicati su animali sierologicamente positivi hanno dato esito negativo [Opsteegh M. *et al.*, 2011].

1.2.1 Metodi sierologici

I metodi sierologici di diagnosi applicati e descritti in “Materiali e metodi” permettono di rilevare la presenza di IgG nel sangue degli animali sottoposti ad analisi. I sieri saggiati, infatti, vengono posti a contatto di antigeni parassitari contenuti nei pozzetti delle piastre ELISA o immobilizzati su superfici inerti (IFA). Gli anticorpi non legati agli antigeni vengono eliminati mediante lavaggio, mentre quelli specifici rimangono bloccati all'interno del pozzetto o sul vetrino e vengono visualizzati grazie all'utilizzo di anticorpi secondari marcati. Il marcatore può essere un fluorocromo, come nel caso del FITC utilizzato nelle procedure IF descritte in “Materiali e metodi”, o un enzima, come nel caso dei saggi ELISA descritti di seguito, in cui l'aggiunta di un substrato cromogeno sviluppa colore, la cui intensità può essere misurata.

L'interpretazione corretta dell'esito del test applicato può essere effettuata solamente tenendo conto della cinetica della risposta anticorpale, schematizzata in Figura 1.1.

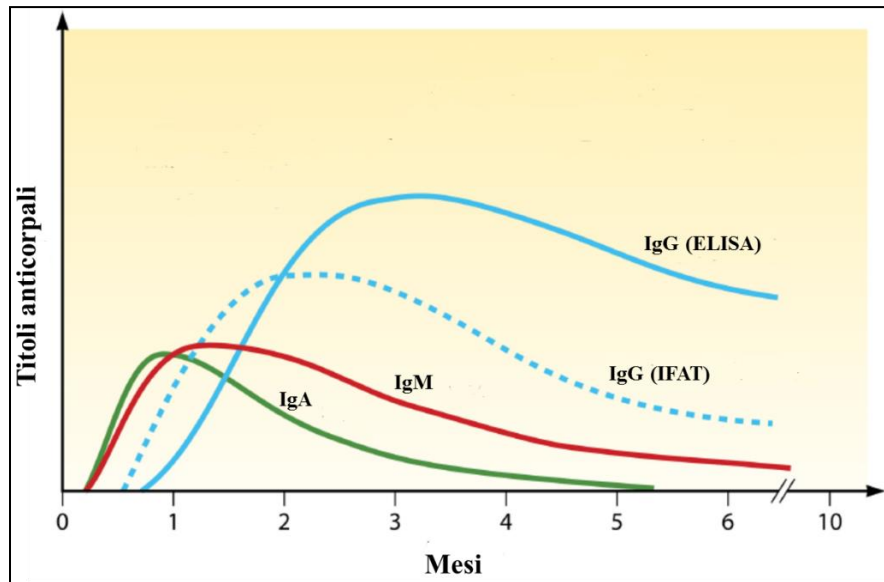


Figura 1.1: Schematizzazione della cinetica di risposta anticorpale [Robert-Gagneux F. *et al.*, 2012].

Durante le prime settimane dall'infezione vengono prodotte IgA ed IgM, le quali raggiungono un plateau nel primo mese post-infezione, per poi diminuire gradualmente e risultare non misurabili nel 25% dei casi da 7 mesi post-infezione e dopo 1 anno nel rimanente 75% [Robert-Gagneux F. *et al.*, 2012], mentre le IgG raggiungono un plateau entro 2-3 mesi post-infezione e poi diminuiscono gradualmente, permanendo per tutta la vita a livelli variabili da soggetto a soggetto. Per questo motivo qualsiasi metodo utilizzato non permette di effettuare una diagnosi dell'infezione distinguendo la fase precoce da quella tardiva della stessa, sebbene metodi come l'Immunofluorescenza, che utilizzano parassiti o antigeni di superficie immobilizzati su superfici inerti, permettano di identificare IgG prodotte prima nel corso dell'infezione rispetto a quelle rilevate dai metodi ELISA, che utilizzano principalmente miscele di antigeni sia citosolici che di superficie.

1.2.2 Tecniche di biologia molecolare, *Real-time PCR* e *Nested PCR*

I metodi di biologia molecolare valutano la presenza di DNA specifico del parassita a livello del tessuto sottoposto ad analisi. Tale valutazione viene effettuata utilizzando dei *primers* che permettano di amplificare regioni del DNA identificative di *T. gondii*. Le due metodiche citate si basano su procedure differenti e presentano geni o regioni *target* differenti. Nel caso della *Nested PCR* la regione *target* è il gene B1, presente nel genoma di *T. gondii* in 35 copie. Si utilizza una prima coppia di *primers* che permette di amplificare una regione lunga 194 bp, mentre la seconda coppia di *primers*, più interna, viene utilizzata sul prodotto della prima amplificazione e genera frammenti lunghi 97 bp. L'avvenuta amplificazione viene verificata mediante corsa elettroforetica ed identificazione delle bande corrispondenti alle dimensioni attese per il frammento di interesse. Nel caso della *Real Time PCR* si effettua un'unica reazione di amplificazione, diretta su una regione *target* ripetitiva di 529 bp, presente in circa 200-300 copie lungo il genoma di *T. gondii* [Marino A.M.F. *et al.*, 2017]. In questo caso l'amplificazione della regione di interesse viene verificata in tempo reale, grazie all'utilizzo di una sonda *Taqman*, un oligonucleotide complementare ad una regione interna della sequenza bersaglio e marcata ad una estremità con un fluorocromo ad alta energia o *Reporter* e all'altra estremità con il *Quencer* (BHQ), un fluorocromo a bassa energia che spegne la fluorescenza del *Reporter*. Se *Reporter* e *Quencer* si trovano vicini, il secondo "spegne" l'effetto del primo assorbendone i fotoni. Via via che il frammento di DNA *target* viene amplificato, la sonda si appaia alla regione specifica ed il suo *Quencer* viene rilasciato, rendendo visibile la fluorescenza emessa dal *Reporter*. All'aumentare del numero di copie di sequenza *target* aumenta l'intensità della fluorescenza emessa dal *Reporter*, che viene rilevata e rappresentata graficamente da una curva ad andamento semilogaritmico. Il graduale esaurimento dei reagenti contenuti nella miscela di amplificazione porta all'arresto della reazione stessa, rappresentato graficamente da una fase di plateau, raggiunta la quale il numero di copie della regione *target* non aumenta più. Il ciclo in corrispondenza del quale inizia la fase esponenziale della reazione dipende dalla quantità di DNA *target* presente nel

campione saggiato. Maggiore è la quantità di gene *target*, minore sarà il numero di cicli di reazione necessari al superamento del segnale di soglia o ciclo di *threshold*, in corrispondenza del quale la fluorescenza emessa risulta rilevabile.

Dalla descrizione delle metodiche di diagnosi risulta chiaro come un esito positivo del test sierologico (ELISA o IFA) indichi che è avvenuto un contatto tra l'ospite ed il parassita ma non necessariamente la presenza di parassiti nel sangue o nei tessuti dell'ospite. Al contrario, i metodi diagnostici di biologia molecolare indicano la presenza di DNA parassitario e quindi di parassiti nel tessuto saggiato. Un esito negativo del test di biologia molecolare, quindi, non indica necessariamente che l'animale non sia positivo alla toxoplasmosi ma che in quella sezione sottoposta ad analisi non erano presenti parassiti. In ragione di quanto detto, laddove venisse riscontrata un'eventuale discordanza tra esito diagnostico positivo con metodo sierologico e negativo con applicazione di tecniche di biologia molecolare, la stessa non deve essere considerata anomala.

1.3 *Toxoplasma gondii*

1.3.1 Generalità

Toxoplasma gondii è un protozoo endocellulare obbligato, appartenente al *phylum* degli *Apicomplexa*, sottoclasse dei coccidi. Presenta una forma ad arco, lungo circa 5 μm e largo circa 2 μm , con un'estremità apicale appuntita ed un'estremità posteriore arrotondata. Il citoplasma è delimitato da una membrana, definita pellicola, strettamente collegata al citoscheletro e responsabile dell'integrità e della motilità cellulare. Una struttura peculiare è rappresentata dall'apicoplasto, un organello simile ad un plastide, probabilmente acquisito ancestralmente in una fase di endosimbiosi secondaria all'interno di un'alga rossa [Roos D.S. *et al.*, 1999]. A livello della porzione apicale sono concentrate delle strutture citoscheletriche specializzate, necessarie per l'invasione della cellula

ospite o conoide e numerosi organuli secretori quali roptries o ROPs, granuli densi e micronemi (Fig 1.2).

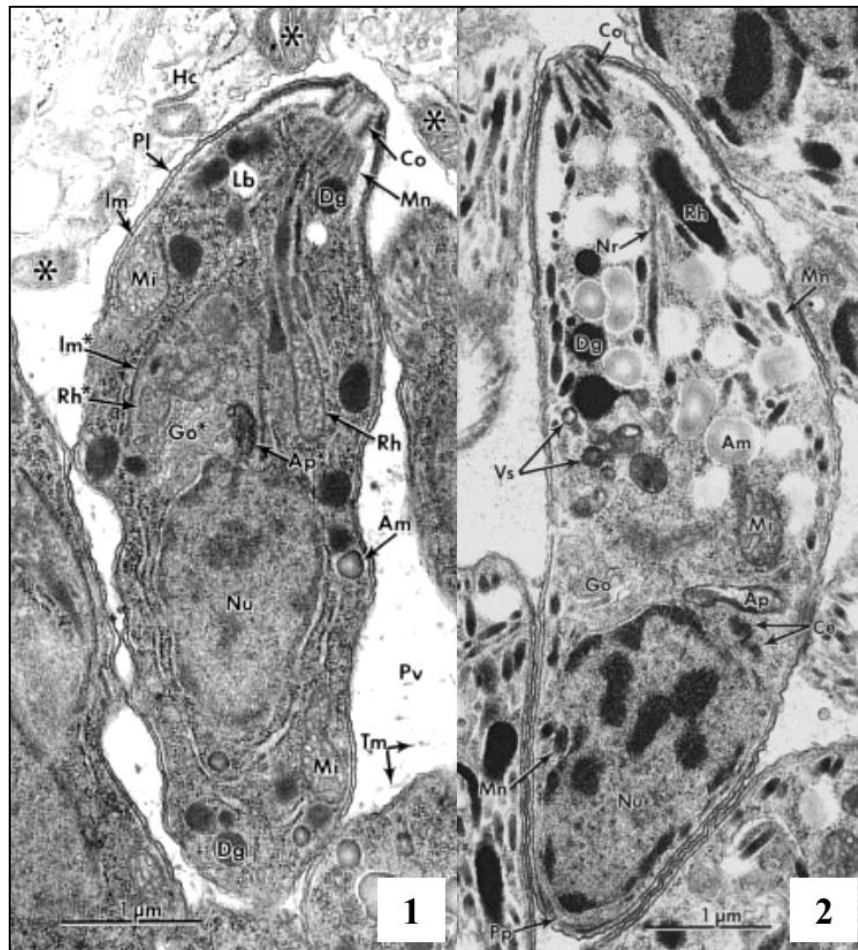


Figura 1.2: Caratteristiche morfologiche e strutturali di *Toxoplasma gondii* [Robert-Gangneux F., Dardé M.L., 2012].

1. Tachizoite in un vacuolo parassitoforo (PV) all'interno di un macrofago peritoneale murino.
2. Bradizoite.

Abbreviazioni: **Ap**- Apicoplasto, **Am**- Amilopectina, **Ce**- Centrioli, **Co**-Conoide, **Go**- Apparato del Golgi, **Hc**- citoplasma della cellula ospite, **Im**- Complesso della membrana interna della pellicola, **Lb**- corpo lipidico, **Mi**- Mitocondrio, **Mn**- Microneme, **No**- Nucleo, **Pl**- Plasmalemma. **Pp**- Poro posteriore

Il parassita presenta un genoma a DNA di circa 2×10^7 bp, con corredo cromosomico aploide, eccetto durante la fase di moltiplicazione sessuata nei

felini. Possono essere distinti tre diversi stadi infettivi, con caratteristiche morfologiche e metaboliche differenti:

- Tachizoiti, a rapida proliferazione. Durante lo stadio invasivo dell'infezione essi invadono le cellule ospite e si moltiplicano rapidamente in esse, all'interno del vacuolo parassitoforo. I tachizoiti possono sopravvivere nei fluidi corporei fino ad un giorno, mentre, nel sangue intero, possono sopravvivere fino a 50 giorni, a una temperatura di 4°C.
- Bradizoiti, a divisione lenta e contenuti all'interno delle cisti tissutali. Essi presentano un metabolismo lento, più adatto alla sopravvivenza per lunghi periodi. Le cisti tissutali assumono solitamente forma sferica nel tessuto nervoso ed allungata nelle cellule muscolari, il cui diametro varia da 10 µm nelle cisti di recente formazione, contenenti solamente 2 bradizoiti, a 100 µm per le cisti più mature, capaci di contenere anche centinaia o migliaia di bradizoiti. Le cisti tissutali mantengono il loro potere infettante, a temperatura ambiente, per settimane nei fluidi corporei e nelle carni, finché queste sono edibili e crude, resistono all'essiccamento nell'ambiente esterno fino ad 1 giorno e all'azione dei succhi gastrici per 1 ora; nelle carni sono distrutte da procedimenti di conservazione quali salatura, affumicatura e da una buona cottura, mentre resistono a lungo a +4°C e al congelamento. La parete delle cisti consta di una membrana esterna, ricca di invaginazioni, e di uno strato granulare elettrone-denso interno [Ferguson D.J., 2004]; in seguito alla morte della cellula ospite la parete può degradarsi e liberare i bradizoiti che possono resistere all'azione acida della pepsina e veicolare la trasmissione dell'infezione mediante ingestione.
- Sporozoiti, protetti all'interno delle oocisti, durante lo stadio di disseminazione e maturazione nell'ambiente esterno. Le oocisti sono strutture ovoidali con diametro di circa 12-13 µm, delimitate da una parete estremamente robusta, capace di resistere tanto ai danni meccanici che chimici dell'ambiente esterno. Ciascuna oocisti, dopo sporulazione, contiene due sporocisti, ciascuna contenente quattro sporozoiti. La parete delle oocisti è costituita da una struttura pluristratificata estremamente robusta, che

protegge il parassita da danni meccanici e chimici, permettendo allo stesso di sopravvivere per lunghi periodi nell'ambiente esterno [Mai K. *et al.*, 2009]. Le oocisti, infatti, possono rimanere infettanti fino a 18 mesi nell'acqua o nei terreni umidi, mentre non sopravvivono bene in condizioni climatiche fredde e asciutte. Esse sono resistenti a disinfezione, congelamento e parziale essiccamento, ma vengono devitalizzate a 70°C per 10 minuti.

1.3.2 Ciclo vitale

Il ciclo vitale di *T. gondii* consiste in un sistema di trasmissione preda-predatore, con l'alternanza di una fase di riproduzione sessuata nell'ospite definitivo ed una fase di replicazione asessuata nell'ospite intermedio. La fase di riproduzione sessuata avviene solamente nei felidi (sia domestici che selvatici), che solitamente contraggono l'infezione mediante l'ingestione di carne contaminata da cisti, proveniente da prede infette. L'ospite definitivo è responsabile della disseminazione di oocisti nell'ambiente, attraverso le feci. Ciò si verifica generalmente una sola volta nella vita e per circa 15 giorni. La sporulazione avviene nell'ambiente esterno, impiega approssimativamente da 1 a 5 giorni in condizioni ambientali favorevoli, ma può impiegare anche alcune settimane. Mediante l'ingestione di acqua, piante ed ortaggi crudi contenenti oocisti, o di carne contaminata da cisti, cruda o poco cotta, l'infezione viene trasmessa ad un'ampia gamma di ospiti intermedi, tecnicamente a tutti gli animali a sangue caldo compresi i volatili e l'Uomo (Fig. 1.3).

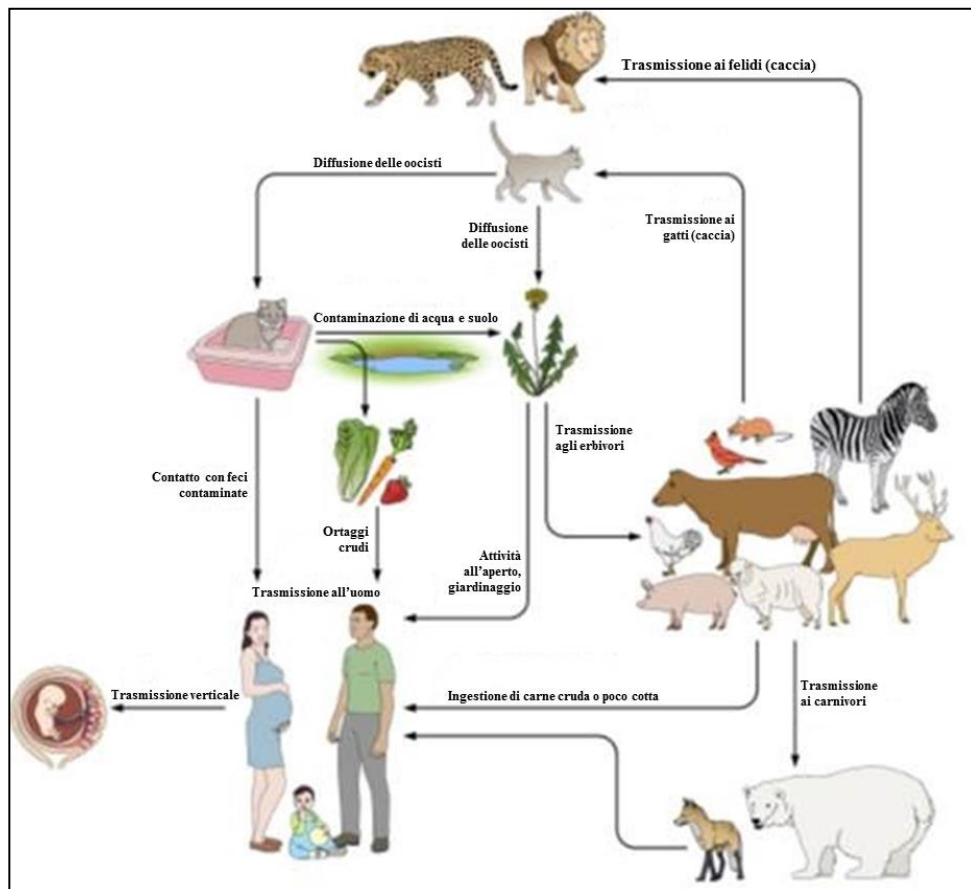


Figura 1.3: Ospiti intermedi e definitivi dell'infestazione e vie di trasmissione [Robert-Gagneux F. & Dardé M.L., 2012].

1.4 Ospiti

1.4.1 Ospite definitivo

I Felidi acquisiscono l'infestazione in seguito ad ingestione di prede infette. In essi il parassita va incontro alla fase riproduttiva sessuata del ciclo vitale. Infatti, quando i bradizoiti raggiungono l'intestino si moltiplicano nelle cellule epiteliali del tenue. Dopo numerosi cicli di riproduzione asexuata, i bradizoiti danno avvio alla fase sessuata del ciclo (gametogonia), che si conclude con la formazione di oocisti non sporulate e la dispersione delle stesse nell'ambiente.

1.4.2 Ospiti intermedi

Oltre che per via alimentare, l'infezione può essere contratta dagli ospiti intermedi anche per via transplacentare, mediante accidentale inoculazione di tachizoiti, trapianti di organi infetti o raramente trasfusioni di sangue. Generalmente, in seguito all'ingestione delle oocisti ed al rilascio di tachizoiti, questi si moltiplicano a livello dell'epitelio intestinale e, mediante il flusso ematico, raggiungono distretti corporei periferici quali muscolo, cuore, cervello, occhi e placenta, dove formano cisti tissutali. Si presume che le cisti tissutali di *T. gondii* vadano incontro a lisi periodiche, con rilascio di bradizoiti. Negli ospiti immunocompetenti, l'immunità impedisce la moltiplicazione dei bradizoiti rilasciati; di contro, negli individui immunodepressi, i bradizoiti possono svilupparsi in tachizoiti, causando una toxoplasmosi clinicamente manifesta.

1.4.3 Sieroprevalenza

Casi di infezione da *T. gondii* sono stati descritti per più di 350 specie animali, con una maggiore diffusione tra le specie selvatiche rispetto a quelle domestiche. Nei felidi selvatici la sieroprevalenza è piuttosto alta e può raggiungere anche il 100% [Lindsay D.S. & Dubey J.P., 2004]. La prevalenza tra gli ospiti intermedi varia maggiormente rispetto agli ospiti definitivi e dipende dalla presenza di questi ultimi nel loro ambiente. I meccanismi di trasmissione dell'infezione tra gli animali selvatici sono particolarmente complessi e dipendono dall'interazione di diversi fattori fisici, biologici ed ecologici, quali:

- condizioni climatiche, con prevalenza più elevata tra animali di zone tropicali ed umide rispetto ad ambienti con clima secco e caldo;
- comportamento alimentare, con una maggiore prevalenza tra carnivori ed onnivori rispetto agli erbivori;
- taglia e peso degli animali, di solito correlata con la durata della vita, che influisce sulla probabilità di entrare a contatto con il parassita;

- grado di suscettibilità di ciascuna specie. Infatti alcune specie possono essere più resistenti di altre o essere capaci di risolvere spontaneamente l'infezione.

La prevalenza di toxoplasmosi tra gli animali da reddito è generalmente bassa negli equini e più elevata in ovi-caprini, suini e pollame, sebbene vari molto in base al sistema di allevamento adoperato. Infatti il numero di animali positivi alla toxoplasmosi è più elevato tra quelli allevati all'aperto piuttosto che provenienti da allevamenti in ambiente chiuso. In Europa, tra gli ovini, la sieroprevalenza è più elevata negli animali adulti rispetto agli agnelli, mentre diffusione ed incidenza della toxoplasmosi tra i bovini costituiscono un tema dibattuto e con dati contrastanti. Le percentuali di animali sieropositivi variano entro un *range* molto ampio (dal 2% al 92%), con tassi più elevati tra i vitelli giovani e gradualmente più bassi all'aumentare delle fasce d'età considerate [Opsteegh M. *et al.*, 2011]. Inoltre, nonostante alcuni studi riportino elevate percentuali di animali sieropositivi, raramente sono state rilevate cisti tissutali in bovini adulti o feti abortiti [Dubey J.P. & Jones J.L., 2008].

1.4.4 Sintomatologia

Nella maggior parte dei casi l'infezione primaria a carico di soggetti sani risulta asintomatica. Nei soggetti giovani o immunodepressi può causare sintomi enterici quali diarrea, disidratazione, dimagrimento e debilitazione. Confrontando le varie specie di potenziali ospiti intermedi per *T. gondii*, si osservano sintomi con livelli di severità differente a seconda della specie considerata:

- negli Equidi esistono pochi casi noti di Toxoplasmosi e, nella stragrande maggioranza dei casi, l'infezione decorre in maniera asintomatica, anche se sono stati descritti episodicamente febbre, encefalite, atassia e degenerazione retinica;

- soprattutto nei ruminanti e nell'Uomo, il parassita riesce a moltiplicarsi a livello della placenta determinando disturbi a carico del feto, quali retinocoroidite, idrocefalo ed encefalite o aborto;
- nei suini sono riportati, occasionalmente, focolai di Toxoplasmosi, caratterizzati da infezioni generalizzate, aborto e mortalità neonatale. Negli animali giovani si può osservare febbre e polmonite interstiziale, con tosse e dispnea; sono stati riportati casi sporadici di astenia, cachessia, atassia, tremori e diarrea;
- sono stati riportati casi di infezioni acute, potenzialmente fatali a carico di marsupiali e primati non umani, con sintomi quali linfadenopatia, epatomegalia, polmonite interstiziale, cecità ed alterazioni a carico del SNC, con conseguenze quali atassia, alterazioni comportamentali, disfagia, perdita di controllo della defecazione e della minzione.

1.4.5 Risposta immunitaria ed Ipobiosi

Solitamente il sito primario d'infezione per *T. gondii* è costituito dall'intestino. In tale distretto corporeo avviene la moltiplicazione dei tachizoiti, che possono successivamente raggiungere la lamina propria attraversando l'epitelio intestinale o infettando e lisando gli enterociti [Barragan A. & Sibley L.D., 2002]. Attraverso la lamina propria il parassita può raggiungere i tessuti periferici, entrando direttamente nel circolo linfatico o ematico, o invadendo cellule dendritiche, macrofagi e neutrofili, che trasferiscono l'infezione agli altri tessuti. Le cellule dendritiche, i macrofagi ed i neutrofili infettati rilasciano IL-12, che a sua volta attiva la differenziazione delle cellule T in Th1 e la sintesi di IFN- γ da parte dei linfociti Th1 e delle cellule Natural Killer (NK) [Denkers E.I. & Gazzinelli R.T., 1998] che guidano la distruzione del parassita. Un ruolo fondamentale in tale attivazione, durante la fase acuta dell'infezione, è svolto da Nod2, recettore capace di fungere da sensore, riconoscendo proteine derivate da *T. gondii*, e di promuovere una risposta immunitaria innata da parte dell'ospite.

L'attività di tale recettore è dunque indispensabile per l'ospite al fine di controllare la replicazione del parassita nel sito d'infezione.

Monociti, neutrofili e cellule dendritiche svolgono un ruolo chiave nelle risposte primarie a *T. gondii*. I primi limitando la proliferazione dei tachizoiti tramite un meccanismo NO-dipendente [Dunay I.R. & Sibley L.D., 2010], i secondi possono uccidere direttamente il parassita mediante meccanismi ossigeno-dipendenti ed ossigeno indipendenti mentre le cellule dendritiche possono fagocitare e distruggere le cellule endoteliali infette in apoptosi, presentando antigeni di *T. gondii* [Dunay I.R. & Sibley L.D., 2010] ed attivando i meccanismi di risposta adattativa. In tali risposte un ruolo fondamentale è svolto dai linfociti T CD8+, che producono citochine pro-infiammatorie come l'IFN- γ , mediano le risposte citotossiche e successivamente rilasciano citochine anti-infiammatorie, quali IL-17 e IL-27, impedendo danni tissutali da iperattivazione infiammatoria.

T. gondii, come altri parassiti, è in grado di entrare in ipobiosi o di passare ad una forma latente, nel corso dell'infezione. A causa della riduzione delle attività metaboliche del parassita, durante questa fase la produzione di antigeni e la conseguente stimolazione immunitaria dell'ospite sono minimi. La cronicizzazione dell'infezione può essere dovuta ad una risposta immunitaria innata dell'ospite inefficace o alla capacità dei parassiti stessi di evadere o resistere all'eliminazione da risposta immunitaria acquisita. Nel caso delle infezioni da *T. gondii* è stato osservato che i livelli cerebrali di linfociti T CD4+ e CD8+ aumentano nelle prime settimane successive all'infezione, mentre diminuiscono gradualmente nella fase di transizione dallo stadio acuto a quello cronico, con una persistenza di bassi livelli di cellule CD8+ durante la fase di latenza [Kwok L.Y., Lütjen S. *et al.*, 2003]. Nonostante il ruolo protettivo predominante nei confronti di *T. gondii* sia attribuito alle risposte cellulo-mediate di tipo I, anche le risposte umorali ricoprono un ruolo importante nell'interazione ospite-parassita. Infatti è stato dimostrato che i linfociti B possono modulare le risposte CD4+ e CD8+ e stimolare ulteriormente la produzione di IFN- γ durante la risposta infiammatoria. Inoltre si ha una produzione di anticorpi in risposta ad infezioni da *T. gondii* che, nei topi, concorrono a limitare la moltiplicazione dei

tachizoiti, soprattutto a livello polmonare e cerebrale [Kang H., *et al.*, 2000] e vengono mantenuti per tutta la vita, anche durante la fase di latenza [Halonen S.K. & Weiss L.M., 2013].

1.4.6 Alterazioni comportamentali e possibili spiegazioni

Data l'assenza di sintomi patologici nella maggior parte di soggetti immunocompetenti positivi alla toxoplasmosi, per molto tempo la condizione di latenza del parassita nei tessuti dell'ospite, incluso il tessuto nervoso, è stata considerata innocua. Negli ultimi dieci anni, tuttavia, un numero crescente di studi indipendenti ha evidenziato una correlazione tra la sieropositività alla toxoplasmosi e diversi disturbi a carico del sistema nervoso, quali: ansia, depressione [Groër M.W. *et al.*, 2011], disturbi dell'umore, tendenze suicide [Hsu P. *et al.*, 2014], disturbi bipolari [Pearce B.D. *et al.*, 2012], disturbi ossessivo-compulsivi [Miman O. *et al.*, 2010a], schizofrenia nei soggetti sieropositivi [Arias I. *et al.*, 2012] e nella prole di donne con elevati titoli anticorpali durante la gravidanza [Brown A.S., 2011- Brown A.S. *et al.*, 2005]. Inoltre sembrerebbe esistere una possibile correlazione tra la sieropositività a *T. gondii* e patologie degenerative del sistema nervoso, quali il morbo di Parkinson [Miman O. *et al.*, 2010b] ed il morbo di Alzheimer [Kusbeci O.Y. *et al.*, 2011], sintomi associati all'autismo, all'epilessia [Yazar S. *et al.*, 2003] e persino ai tumori al cervello [Thomas F. *et al.*, 2012; Vittecoq M. *et al.*, 2012]. In modelli murini è stato osservato come l'infezione da *T. gondii* determini alterazioni comportamentali quali una maggiore attrazione degli stessi verso l'odore dei felini, una maggiore attività ed una minore neofobia, finalizzati ad indurre nelle prede infette una "attrazione fatale" verso il predatore e favorire il completamento del proprio ciclo biologico. Pertanto è comprensibile quali vantaggi potrebbe determinare per il parassita la manipolazione e l'alterazione funzionale a carico del sistema nervoso dell'ospite, in termini di completamento del ciclo vitale e diffusione dello stesso. Tuttavia i meccanismi neuroendocrini e molecolari tramite i quali tali alterazioni vengono indotte ed eventuali discrepanze tra le diverse

specie animali più o meno suscettibili alla toxoplasmosi, sono scarsamente conosciute.

Uno studio del 2014, effettuato su modelli murini, ha rilevato un incremento dei livelli di dopamina nel tessuto muscolare striato di animali infettati da *T. gondii* rispetto al gruppo controllo pari al 38% [Xiao J., Li Y. *et al.*, 2014]. Per quanto riguarda le alterazioni a carico del sistema nervoso, i dati bibliografici a disposizione risultano contrastanti. Infatti alcuni studi svolti su modelli murini hanno rilevato un incremento dei livelli di dopamina nel sistema nervoso di animali infettati da *T. gondii* [Stibbs H.H., 1985- Ihara F. *et al.*, 2016] mentre un altro studio svolto su ceppi murini differenti non ha confermato tale dato [Wang Z.T. *et al.*, 2015]. Nonostante ciò, tuttavia, non può essere messo in discussione un coinvolgimento dei segnali dopaminergici, mentre risultati piuttosto controversi e certamente da approfondire ulteriormente derivano dagli studi che si sono focalizzati sulle variazioni dei livelli di serotonina. Infatti sono riportati dati differenti non solo in base al tessuto considerato, ma anche in funzione della razza, del ceppo o del sesso degli animali utilizzati [Xiao J. *et al.*, 2014; Gatkowska J. *et al.*, 2013; Goodwin D. *et al.*, 2012]. Considerando che i disordini depressivi, cognitivi ed alcune patologie di cui si ipotizza una correlazione con la condizione di sieropositività alla toxoplasmosi sono caratterizzati da una deplezione della serotonina, o vengono trattati mediante la somministrazione di farmaci che inducono un incremento dei livelli di serotonina [Yohn C.N. *et al.*, 2017], ci si aspetterebbe una diminuzione dei livelli di questo neurotrasmettitore nel tessuto nervoso di animali infetti. Tuttavia alcuni studi condotti su modelli murini non hanno riportato alcuna variazione significativa [McConkey G.A. *et al.*, 2013], mentre uno studio del 2013 ha riportato un aumento del neurotrasmettitore in alcune aree cerebrali di modelli murini maschi durante la fase acuta dell'infezione [Gatkowska J. *et al.*, 2013]. È stata riportata, inoltre, una maggiore concentrazione di serotonina nel tessuto muscolare striato di topi infetti rispetto al gruppo controllo [Xiao J. *et al.*, 2014], mentre non sono stati riscontrati in bibliografia dati relativi ad eventuali variazioni di serotonina circolante in risposta all'infezione da *T. gondii*.

1.4.7 Serotonina circolante ed immuno-modulazione

La serotonina o 5-HT viene sintetizzata a partire dal triptofano a livello di aree specifiche del sistema nervoso e nelle cellule enterocromaffini dell'intestino. Essa è a sua volta precursore di un neurotrasmettitore fondamentale nella regolazione dei ritmi sonno-veglia, la melatonina. Una via metabolica alternativa, che sottrae triptofano alla biosintesi di serotonina, è catalizzata dall'enzima Indoleamina 2-3 diossigenasi (IDO) e conduce alla sintesi di chinurenina. Le vie di biosintesi citate sono schematizzate in Figura 1.4.

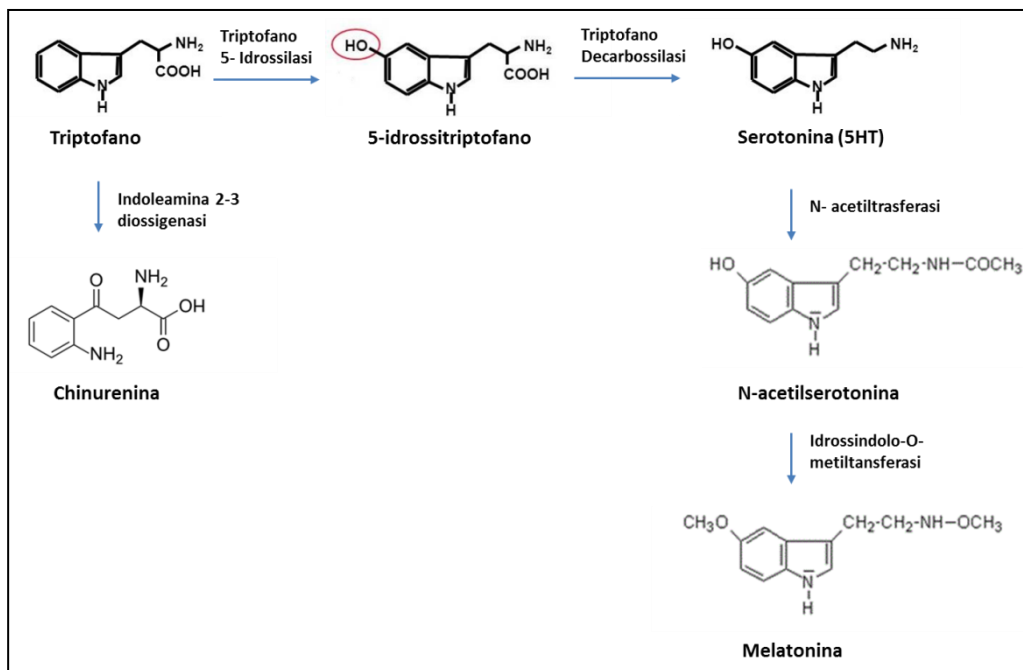


Figura 1.4: Vie di biosintesi di serotonina, chinurenina e melatonina.

La serotonina ha due ruoli differenti: a livello centrale, come neurotrasmettitore, regola il sonno, l'appetito, l'umore ed altre importanti funzioni cerebrali; a livello periferico, come ormone, regola diverse funzioni, comprese quelle immuno-modulatorie, come mostrato in Figura 1.5.

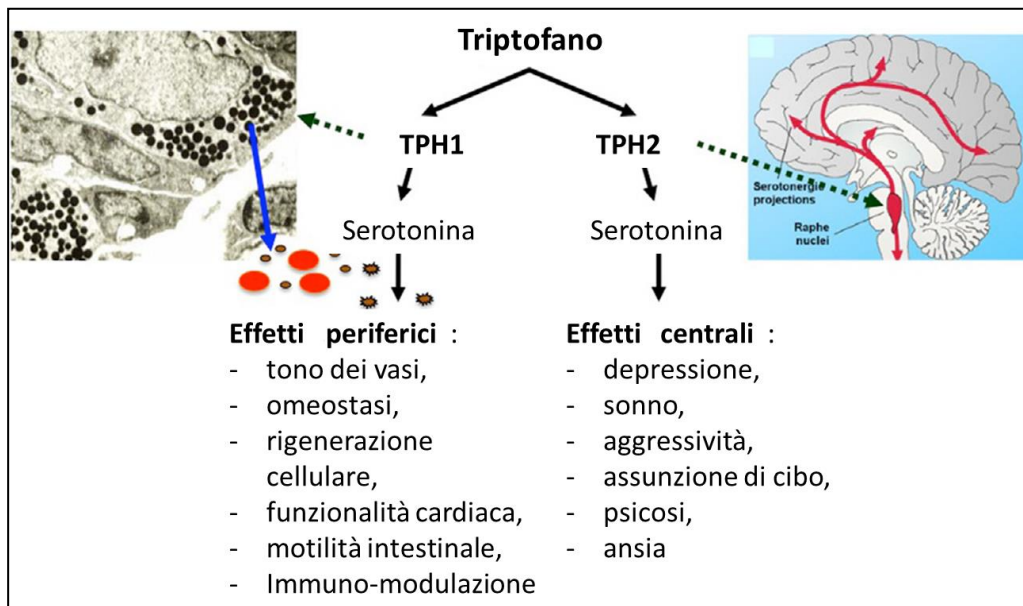


Figura 1.5: Funzioni centrali e periferiche della serotonina [Herr N. *et al.*, 2017].

Un sito di accumulo specifico per la serotonina è costituito dalle piastrine, che la contengono in elevate concentrazioni all'interno di granuli densi, per rilasciarla in seguito ad aggregazione nei siti di danno tissutale. Essa svolge un ruolo fondamentale tanto nelle risposte innate che in quelle adattative, stimola infatti sia i monociti [Dürk T. *et al.*, 2005] che i linfociti [Iken K. *et al.*, 1995], influenzando la secrezione di citochine. Diversi studi giungono a conclusioni apparentemente contraddittorie sul ruolo svolto dalla serotonina nelle risposte immunitarie, riportando in alcuni casi funzioni pro-infiammatorie [Ito T. *et al.*, 2000] ed in altri anti-infiammatorie [Yu B. *et al.*, 2008; Nau F. Jr *et al.*, 2013].

Tale ormone sembrerebbe coinvolto nella modulazione di tutte le classi cellulari responsabili delle risposte immunitarie, sebbene spesso gruppi di ricerca differenti siano giunti a conclusioni contrastanti, evidenziando effetti opposti, generalmente di tipo dose-dipendente [Sternberg E.M. *et al.*, 1986; Sternberg E.M. *et al.*, 1987] o in base alla classe di recettore attivato [Cloez-Tayarani I. *et al.*, 2003; Fiebich B.L. *et al.*, 2004; Kubera M. *et al.*, 2005; Tsuchida Y. *et al.*, 2011]. Quindi, attualmente, può essere affermato un ruolo importante della serotonina circolante

in diverse funzioni immuno-modulatorie, come schematizzato in Figura 1.6, sebbene le conoscenze disponibili debbano essere ulteriormente approfondite.

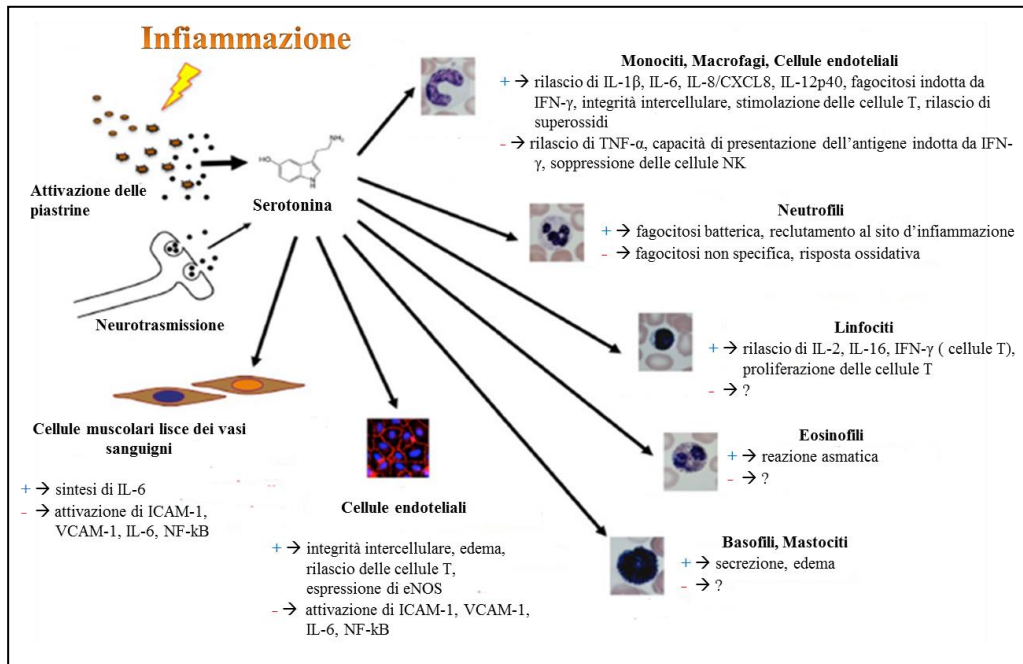


Figura 1.6: Panoramica della complessità di funzioni svolte dalla serotonina in risposte infiammatorie ed immunitarie [Duerschmied D. *et al.*, 2014].

+ → stimolazione; - → inibizione

Meccanismi serotonina-dipendenti sono stati descritti per il reclutamento di cellule dendritiche [Müller T. *et al.* 2009] e di neutrofilii [Duerschmied D. *et al.*, 2013; Herr N. *et al.*, 2014], per il reclutamento e l'adesione dei leucociti [Walther A. *et al.*, 2007], nonché per il rilascio di citochine [Müller T. *et al.*, 2009] al sito di infiammazione. Sui neutrofilii, inoltre, è stato osservato un effetto inibitorio della serotonina sulla produzione di specie reattive dell'ossigeno [Jancinova V. *et al.*, 2001; Cíz M. *et al.*, 2007]. Studi condotti sull'Uomo hanno dimostrato che a concentrazioni fisiologiche di serotonina circolante (1-10 μM) la difesa antibatterica viene potenziata (probabilmente per una ridotta auto-ossidazione) mentre a concentrazioni superiori (1-10 mM) risulta meno efficace.

I Linfociti T esprimono numerosi recettori per la serotonina, nonché altre componenti molecolari correlate al sistema serotoninergico (come TPH1, SERT e MAO) [Herr N. *et al.*, 2017], che agisce su questa classe cellulare stimolando processi quali reclutamento [Askenase P.W. *et al.*, 1991], proliferazione [Nordlind K. *et al.*, 1992] e attivazione [Léon-Ponte M. *et al.*, 2007].

I linfociti B, sotto effetto di una stimolazione del sistema serotoninergico, vanno incontro a proliferazione [Iken K. *et al.*, 1995] ed attivazione, osservazioni confermate anche da uno studio del 2010, che ha riportato come la somministrazione di inibitori selettivi del *reuptake* della serotonina determinino un incremento del numero di linfociti B circolanti in pazienti con disturbi depressivi [Hernandez M.E. *et al.*, 2010]. Come dimostrato da diversi studi condotti negli anni '90, un'altra popolazione cellulare del sistema immunitario la cui attività è modulata dalla serotonina è costituita dalle cellule Natural killer. Infatti l'ormone sopprime la comunicazione tra le NK e i monociti, le prime, quindi non subendo più l'inibizione da parte dei secondi, presentano un incremento di attività citotossica e produzione di IFN- γ [Hellstrand K., Hermodsson S., 1993; Hellstrand K., Hermodsson S., 1990; Hellstrand K. *et al.*, 1993]. Tali osservazioni sono confermate dal fatto che la somministrazione di inibitori selettivi per il *reuptake* della serotonina inducono un potenziamento delle attività delle cellule NK in vitro [Evans D.L. *et al.*, 2008] ed una maggiore proliferazione cellulare a lungo termine [Hernandez M.E. *et al.*, 2010]. Sulla base delle osservazioni elencate, risulta evidente come la serotonina costituisca un *target* promettente per la modulazione delle risposte immunitarie, nonché un fattore coinvolto in innumerevoli alterazioni patologiche. Per questo motivo potrebbe essere interessante valutare la presenza di una differenza specie-specifica nella variazione dei livelli circolanti di questo ormone in animali positivi all'infezione da *T. gondii* rispetto ai sani e se questa differenza possa essere in qualche modo correlata al diverso grado di suscettibilità riscontrato tra alcune specie animali.

1.4.8 Molecole-chiave delle risposte cellulari dell'ospite e toxoplasmosi

Nelle interazioni ospite-parassita, l'assetto molecolare del primo e come questo possa variare tra animali infetti e sani o tra le diverse specie, costituisce un altro aspetto importante da valutare e sul quale è stata rivolta recentemente l'attenzione dei ricercatori. Nonostante risulti piuttosto complicato riuscire ad identificare dei potenziali *targets* tra l'enorme quantità di molecole codificate ed espresse dai diversi tessuti e sebbene molti dei *pathways* molecolari alterati da *T. gondii* risultino ancora sconosciuti o non totalmente compresi, diversi studi hanno permesso di identificare una serie di molecole variamente coinvolte nelle risposte a tale parassitosi e per le quali, quindi, sarebbe interessante valutare eventuali discrepanze specie-specifiche.

Di seguito vengono riportate le molecole considerate maggiormente interessanti ed una breve descrizione delle funzioni svolte dalle stesse o del grado di correlazione alle risposte a *T. gondii* eventualmente riscontrato:

- 1) HIF1 α o *Hypoxia-inducible factor1 α subunit*. HIF è un regolatore trascrizionale di molti geni. Finora ne sono stati identificati più di 500 nell'Uomo [Franke K. *et al.*, 2013]. Come mostrato in Figura 1.7 la subunità α viene stabilizzata in condizioni di ipossia e migra a livello nucleare, dove lega la subunità β , in un complesso attivo, che agisce da regolatore dell'espressione genica. HIF β è espresso in maniera ubiquitaria, mentre sono state individuate due isoforme differenti della subunità α : HIF1 α e HIF2 α . La prima è ubiquitaria, mentre la seconda è espressa principalmente nelle cellule endoteliali, gliali, interstiziali dei reni, nei cardiomiociti e negli epatociti [Franke K. *et al.*, 2013].

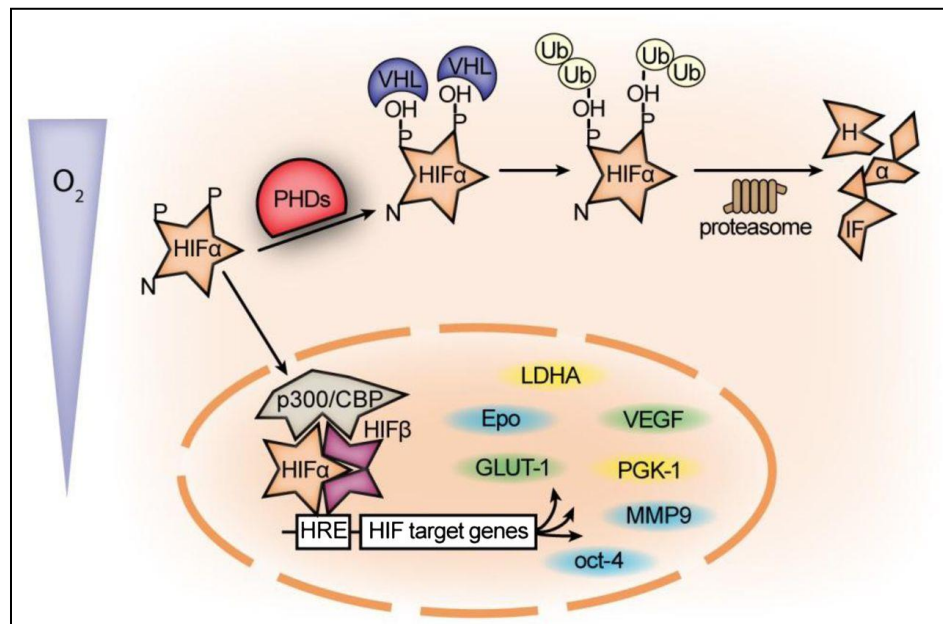


Figura 1.7: *Pathways* di degradazione ed attivazione di HIF. HIF1 α ed HIF2 α presentano alcuni geni *target* in comune, evidenziati in verde ed altri specifici, evidenziati rispettivamente in giallo e blu. [Franke K. *et al.*, 2013].

HIF1 α è un fattore di trascrizione implicato nei processi di risposta alle infezioni da parte di diversi agenti infettanti, tra cui *T. gondii*. Esso stimola processi quali glicolisi, angiogenesi, proliferazione cellulare ed eritropoiesi [Werth N. *et al.*, 2010]. Tale proteina ha un duplice significato nell'interpretazione del decorso della patologia in quanto i suoi livelli di attività risultano elevati in corso di infezione acuta e ridotti in corso di infezione cronica; inoltre livelli elevati di attività di questa proteina risultano protettivi nei confronti dell'ospite in caso di infezione intestinale, mentre provocano una maggiore severità delle condizioni di salute dello stesso nel caso in cui il parassita superi la barriera intestinale provocando un'infezione sistemica [Werth N. *et al.*, 2010]. Secondo uno studio condotto su cellule in vitro e pubblicato nel 2009, l'infezione da *T. gondii* provocherebbe indirettamente l'attivazione del fattore HIF1, per cui un incremento dell'attività di HIF rispetto alle condizioni basali, durante le prime fasi dell'infezione, risulterebbe favorevole per il parassita.

- 2) PHD2. In condizioni di normossia PHD mantiene idrossilati due domini di prolina altamente conservati di HIF. I residui di prolina idrossilati vengono riconosciuti come siti di ubiquitinazione, comportando la degradazione di HIF. I livelli di proteina e di mRNA codificante influiscono in modo diretto sull'attività di PHD, perché l'idrossilazione di HIF è un processo irreversibile [Barth S. *et al.*, 2009]. Sono state individuate tre isoforme di PHD: PHD1 è espresso principalmente a livello dei testicoli, PHD2 è ubiquitario e PHD3 è maggiormente espresso a livello cardiaco. PHD2 è stato identificato come il principale regolatore di processi quali vascolarizzazione [Takeda K. *et al.*, 2007], eritropoiesi [Takeda K. *et al.*, 2008] ed una sua disregolazione è stata correlata a patologie quali policitemia e cardiomiopatia [Minamishima Y.A. *et al.*, 2008].
- 3) Akt1. Le proteine Akt o PKB (*Protein Kinase B*) costituiscono una famiglia di serina/treonina chinasi. Dalla loro prima individuazione, nel 1991, queste proteine si sono dimostrate dei mediatori-chiave importanti in moltissime funzioni cellulari (quali proliferazione, migrazione, apoptosi, angiogenesi) e metaboliche. Agiscono infatti a valle del pathway molecolare IGF1/PI3K di risposta all'insulina. Nei mammiferi possono essere distinte tre diverse isoforme con alcune funzioni comuni ed altre isoforma-specifiche, nonché con una diversa localizzazione tissutale: Akt1 o PKB α , Akt2 o PKB β e Akt3 o PKB γ . Akt1 è espressa in maniera ubiquitaria e giocherebbe un ruolo essenziale nei processi di apoptosi e sopravvivenza cellulare, regolando la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare [Toker A. & Marmiroli S., 2014]; Akt2 è maggiormente espressa in tessuti insulino-responsivi, come il tessuto adiposo, muscolare ed il fegato e sembrerebbe fondamentale nell'attivazione di meccanismi di captazione ed utilizzo del glucosio, mentre Akt3 è espresso principalmente nel tessuto nervoso e gioca un ruolo importante nello sviluppo post-natale dello stesso [Yu H. *et al.*, 2015]. Oltre ad una differente distribuzione tissutale, queste proteine presentano anche una diversa compartimentalizzazione cellulare. Infatti Akt1 presenta una localizzazione principalmente citoplasmatica e membranale, Akt2 è

localizzata preferenzialmente a livello citosolico in prossimità dei mitocondri e Akt3 a livello nucleare, sebbene questa distribuzione possa variare in base al tessuto considerato (Akt1 è stata isolata anche nel nucleo dei macrofagi) [Yu H. *et al.*, 2015]. Inoltre Akt1 ed Akt2 presentano molti *targets* a livello nucleare e possono traslocare dal citoplasma al nucleo mediante sistemi *shuttle* specifici, in seguito a stimolazione da parte di specifici fattori di crescita.

- 4) PI3K (*Phosphatidylinositide 3-kinase*). Il *pathway* molecolare di PI3K media un ampio range di processi cellulari, quali sopravvivenza, migrazione, divisione, differenziazione, proliferazione. Una disregolazione a carico di questa proteina o di mediatori *target* a valle è stata correlata ad alterazioni nelle fasi del ciclo cellulare e dell'equilibrio apoptosi/proliferazione, studiati soprattutto in relazione a diverse forme tumorali [Vanhaesebroeck B. *et al.*, 2010].

Come risulta evidente dalla rappresentazione schematica dei loro *pathways* molecolari (Fig.1.8) le proteine Akt sono degli effettori molecolari di PI3K e l'attività enzimatica di entrambe le proteine citate è contrastata dall'azione di diverse fosfatasi, tra le quali PTEN.

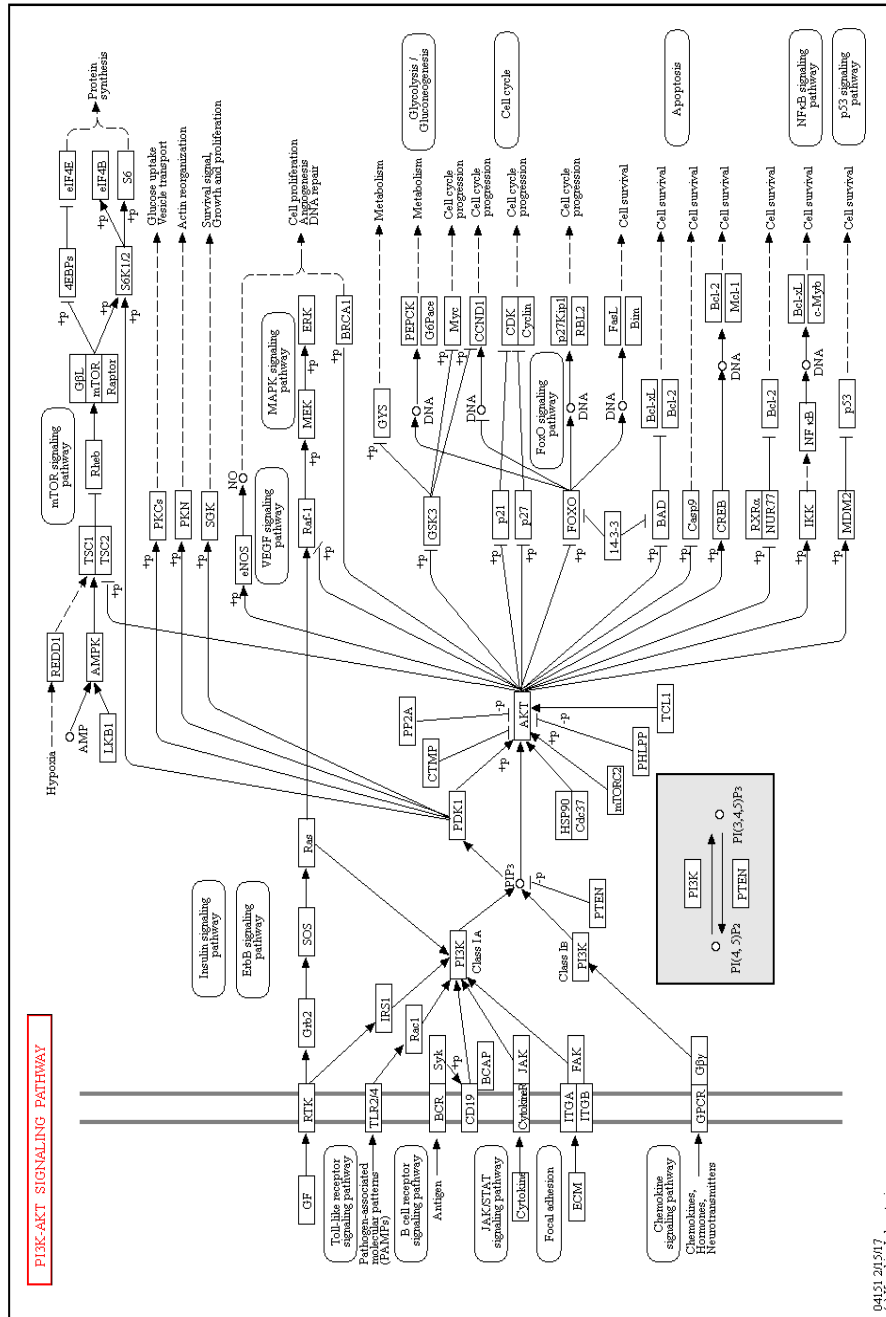


Figura 1.8: Rappresentazione schematica del pathway molecolare PI3K-AKT [KEGG Pathway].

- 5) PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*). PTEN è una fosfatasi, può svolgere la propria attività enzimatica su targets molecolari sia di natura proteica che di natura lipidica. Nei confronti di Akt presenta un'azione inibitoria e mutazioni geniche o alterazioni dei livelli di espressione di PTEN determinano un'attivazione costitutiva di Akt, con conseguente incremento della proliferazione cellulare e resistenza all'apoptosi [Toker A. & Marmiroli S., 2014]. Questa molecola è stata localizzata sia a livello nucleare che citosolico e può svolgere anche altre funzioni regolatorie, non associate all'attività di fosfatasi. È stato riportato che la sumoilazione a livello del residuo di Lisina K254 di PTEN è critica perché essa rimanga a livello nucleare e venga attivata, condizione in cui si ha una rapida traslocazione dell'antigene PCEN (*proliferating cell nuclear antigen*) a livello nucleare e la formazione di un complesso PCEN-p21 Cip1 che determina la degradazione della ciclina D1, con arresto del ciclo cellulare in assenza di Akt [Davis W.J. *et al.*, 2015]. Quanto descritto sottolinea l'importanza dell'equilibrio Akt/PTEN a livello nucleare per la regolazione del ciclo cellulare e dei meccanismi di proliferazione/apoptosi.
- 6) MEK3 (*Mitogen-activated protein kinase 3*). Le MAPK costituiscono una famiglia di proteine che regolano varie risposte cellulari a numerosi fattori esterni quali ormoni, fattori di crescita, citochine e stress. Esse sono inoltre dei fattori chiave nella regolazione di processi cellulari quali crescita, differenziazione, sopravvivenza nonché funzionalità nervosa e risposte immunitarie. Una perdita di funzionalità del *pathway* molecolare delle MAPKs è implicata nello sviluppo di forme tumorali, di diverse patologie a carico del sistema immunitario e nervoso [Yang S.H. *et al.*, 2013]. Uno studio del 2014 svolto su cellule di neuroepitelioma umano in vitro ha rilevato come durante la fase acuta dell'infezione *T. gondii* determini un'inibizione dell'espressione di MEK3 [Xiao J. *et al.*, 2014].

SCOPO DEL LAVORO

La Toxoplasmosi è una parassitosi diffusa a livello globale ed una tra le zoonosi di origine alimentare più diffuse in Europa [Report EFSA, 2016]. Il parassita presenta la capacità di infettare ed adattarsi virtualmente a qualsiasi specie animale, tanto tra gli animali selvatici quanto tra le specie domestiche, compreso l’Uomo. Nonostante tale diffusione e spiccata adattabilità d’ospite, diversi studi hanno messo in evidenza sia livelli di sieroprevalenza che grado di recrudescenza dei sintomi correlati, variabili da una specie all’altra. Pur tenendo conto del fatto che sul diverso livello di incidenza e sul diverso grado di severità dei sintomi osservati tra le diverse specie animali influiscano anche fattori ambientali o esterni, quali condizioni climatiche, comportamento alimentare (carnivoro, onnivoro o erbivoro), sistema di allevamento adoperato, certamente ciascuna specie presenta naturalmente un diverso grado di suscettibilità a tale parassita.

Lo studio effettuato si è focalizzato principalmente sul diverso grado di sensibilità riscontrato tra gli equini, considerati maggiormente “resistenti” [Montoya and Liesenfeld, 2004], i ruminanti ed i suini, caratterizzati da grado di suscettibilità maggiore rispetto ai primi ma variabile tra una specie e l’altra. In particolare, lo scopo dello studio effettuato è stato quello di valutare diversi parametri, ipoteticamente o evidentemente correlati alla risposta ad infezioni da *Toxoplasma gondii*, nelle diverse specie citate precedentemente, effettuando una comparazione tra animali positivi all’infezione e animali sani (gruppo controllo) di ciascuna specie e tra una specie e l’altra. Tali analisi sono state effettuate allo scopo di identificare potenziali indicatori di risposte immunitarie, che portano ad una cronicizzazione dell’infezione o ad una risoluzione della stessa, e di chiarire meglio le basi fisiologiche e molecolari della diversa suscettibilità di specie a *T. gondii*.

Facendo riferimento ai parametri ormonali, nello specifico sono stati valutati i livelli di serotonina circolante. Tale ormone, infatti, sembrerebbe coinvolto nella regolazione tanto delle risposte immunitarie innate che adattative, sebbene diversi studi giungano a conclusioni apparentemente contraddittorie sul ruolo svolto dalla stessa, riportando in alcuni casi funzioni pro-infiammatorie [Ito T. *et al.*, 2000] ed in altri anti-infiammatorie [Yu B. *et al.*, 2008; Nau F. Jr *et al.*, 2013].

I *pathways* molecolari valutati sono riconducibili tanto a risposte immunitarie quanto metaboliche. In particolare, nello studio condotto, sono stati valutati i livelli d'espressione della subunità α del fattore di trascrizione HIF (HIF1 α) e del suo modulatore negativo PHD2, delle chinasi PI3K e Akt1/Pkb e della fosfatasi PTEN, della MAP chinasi MEK3 e del recettore Nod2. Negli animali presi in considerazione, inoltre, sono stati valutati alcuni parametri generali di benessere, in particolare dei *markers* di stress (emocromo completo, ematocrito, proteine totali, glucosio, emoglobina) ed attività enzimatiche la cui variazione in risposta a tale parassitosi è stata valutata in altri ospiti (LDH).

MATERIALI E METODI

Le analisi descritte sono state effettuate su organismi animali di specie equina, ovina, bovina e suina. I campioni analizzati sono stati prelevati tanto da animali vivi in allevamento, quanto da animali macellati, le cui carni erano destinate al consumo umano. Tutti i campioni prelevati sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione fino all'arrivo presso il laboratorio.

I campioni prelevati da animali vivi in allevamento sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni:

- determinazione della positività o negatività all'infezione da *T. gondii* mediante ricerca indiretta di anticorpi specifici nel siero;
- emocromo e valutazione di parametri ematochimici in animali positivi e negativi all'infezione, allo scopo di valutarne lo stato globale di benessere;
- determinazione della concentrazione di serotonina nel plasma di animali positivi e negativi all'infezione.

I campioni prelevati da animali macellati sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni:

- determinazione della positività o negatività all'infezione da *T. gondii* mediante ricerca indiretta di anticorpi specifici nel siero;
- determinazione della contaminazione da cisti di *T. gondii* dei tessuti d'elezione, mediante ricerca diretta del DNA del parassita;
- analisi dei profili d'espressione di proteine chiave delle risposte immunitarie o ipoteticamente correlate alla toxoplasmosi in animali positivi e negativi all'infezione mediante *Real-time* PCR.

3.1 Determinazione della positività o negatività all'infezione da *Toxoplasma gondii* mediante ricerca indiretta di anticorpi specifici nel siero

I campioni di sangue intero prelevati sono stati posti in provette per siero e processati secondo il protocollo indicato di seguito:

- lasciare il sangue in provette per siero a temperatura ambiente per 30 minuti;
- centrifugare a 2000 g (rcf) per 15 minuti a 4°C;
- prelevare il surnatante.

Il siero ottenuto è stato distribuito in aliquote e conservato a -20°C per essere sottoposto alle successive analisi.

Per i campioni provenienti da ovini è stata applicata la procedura validata e accreditata ACCREDIA dal Centro di Referenza Nazionale per la Toxoplasmosi (Ce.Tox) “POS-Ce.Tox01: Diagnosi sierologica di Toxoplasmosi mediante ELISA in emosieri ovini e caprini (Priocheck Ab SR)”, utilizzando il Kit ELISA “*PrioCHECK Toxoplasma Ab SR*”. I valori di densità ottica sono stati rilevati a $\lambda=450$ nm ed elaborati per calcolare le percentuali di positività (*PP*) del controllo debolmente positivo e dei campioni, secondo la formula riportata di seguito:

$$PP = \frac{OD450 \text{ nm campione o WPC} - OD450 \text{ nm NC}}{OD450 \text{ nm PC} - OD450 \text{ nm NC}} * 100$$

Legenda:

PC = Controllo positivo, media delle due letture

WPC = Controllo debolmente positivo, media delle due letture

3 | *Materiali e metodi*

NC= Controllo negativo, media delle due letture

Di seguito vengono riportati i criteri di validazione del Test, necessari per accettare i risultati:

- media degli OD_{450 nm} del PC $\geq 1,2$
- PP del WPC $\geq 35\%$
- media degli OD_{450 nm} del NC $< 0,15$

Per valori di PP $> 20\%$ il campione è stato considerato positivo all'infezione da *T. gondii*, per valori di PP $< 20\%$ il campione è stato considerato negativo.

Per i campioni provenienti da bovini e suini è stato utilizzato il Kit ELISA “ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multi-species”, applicando rispettivamente i metodi accreditati ACCREDIA dal Ce.Tox “PdP-SER CT02: Diagnosi Toxoplasmosi mediante ELISA- multispecie” e “POS Ce.Tox02: Diagnosi sierologica di Toxoplasmosi mediante ELISA in emosieri suini (Priocheck Ab porcine)”. I valori di densità ottica sono stati rilevati a $\lambda=450$ nm ed elaborati per calcolare le percentuali S/P %, secondo la formula riportata di seguito:

$$\frac{S}{P} \% = \frac{OD \text{ campione} - OD \text{ CN}}{OD \text{ CP} - OD \text{ CN}} * 100$$

Legenda:

CP = Controllo positivo, media delle due letture

CN= Controllo negativo, media delle due letture

Di seguito vengono riportati i criteri di validazione del Test, necessari per accettare i risultati:

- media degli OD_{450 nm} del CP $> 0,35$

- media degli OD_{450 nm} del CP / Media degli OD_{450 nm} del CN > 3

Per valori di SP% > 50% il campione è stato considerato positivo all'infezione da *T. gondii*, per valori di SP% ≤ 40 % il campione è stato considerato negativo all'infezione, per valori 40% < SP% < 50% il campione è stato considerato dubbio ed escluso dalle analisi successive.

Per i campioni provenienti da equini è stata applicata la metodica di Immunofluorescenza messa a punto dal Ce.Tox, utilizzando il kit "*Toxoplasma gondii IFA-Equine IgG Antibody Kit*"-Fuller Laboratories. La lettura è stata effettuata mediante microscopio a fluorescenza, con obiettivo ad ingrandimento 400X.

Interpretazione dei risultati

L'esito positivo o negativo viene espresso in seguito al confronto delle fluorescenze osservate per ciascun campione con i controlli positivo e negativo. Nel controllo positivo si osserva una fluorescenza verde accesa ed uniforme per l'intero diametro dei tachizoiti immobilizzati sui pozzetti. Nel controllo negativo non si osserva alcuna fluorescenza o in alternativa si osserva una fluorescenza ridotta e limitata alla porzione apicale dei tachizoiti, determinata da una reazione aspecifica con le porzioni Fc degli anticorpi. I campioni saggiati vengono considerati positivi se presentano aspetto comparabile al controllo positivo e negativi se presentano aspetto comparabile al controllo negativo.

3.2 Determinazione della contaminazione dei tessuti d'elezione da cisti di *Toxoplasma gondii*, mediante ricerca diretta del DNA del parassita

I campioni da sottoporre a tale analisi sono stati prelevati *post mortem* da animali macellati, le cui carni erano destinate al consumo umano.

Da ciascun animale da sottoporre ad analisi sono state prelevate sezioni di diversi tessuti d'elezione per la contaminazione da cisti di *T. gondii*. I campioni sono stati posti in contenitori sterili, mantenuti a temperatura di refrigerazione e lavorati freschi o congelati a -20°C fino all'applicazione delle successive lavorazioni.

3.2.1 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dai campioni è stata effettuata utilizzando il Kit “*E.Z.N.A. Tissue DNA Kit*” OMEGA. I campioni sono stati conservati a -20°C fino all'applicazione delle successive analisi. Il DNA estratto è stato quantizzato ed analizzato mediante *Real-Time PCR*, al fine di individuare l'eventuale presenza di DNA di *T. gondii*.

3.2.2 Real-time PCR

Il saggio diagnostico citato è stato effettuato applicando il metodo validato ed accreditato ACCREDIA dal Ce.Tox per la PCR *Real-Time* “POS-Ce.Tox03, Rev. nr1: Real-Time PCR per la diagnosi di Toxoplasmosi”. La regione target di riferimento per la metodica applicata è una sequenza ripetitiva di 529 bp, presente in circa 200-300 copie lungo il genoma di *T. gondii*. Al fine di rilevare la presenza del prodotto di amplificazione è stata utilizzata una sonda *Taqman* marcata con marcatore fluorescente FAM, che emette fluorescenza a 495nm $<\lambda < 570$ nm. Il controllo positivo di riferimento utilizzato nelle procedure descritte di seguito è il DNA genomico ATCC 50174DTM, estratto da parassiti RH-88 propagati su cellule VERO, risospeso in Buffer TE 1X ad una concentrazione di almeno 2 µg/ml.

Le sequenze dei *primers* e della sonda specifica utilizzati sono riportati in Tabella 3.1.

Tabella 3.1: Sequenze di primers e sonda specifica utilizzati in *Real-time PCR*.

Oligonucleotide	Sequenza 5' → 3'
Primer AF1 (Forward)	CACAGAAGGGACAGAAGT
Primer AF2 (Reverse)	CTGACATCTACTTCCGCT
Sonda	FAM-CTCTCCTCCAAGACGGCTGG-BHQ

La miscela di reazione è stata allestita sotto cappa a flusso laminare, mantenendo tutte le componenti in ghiaccio. Per la preparazione della stessa è stata utilizzata la Master Mix “*Taqman Genotyping Master Mix, Applied Biosystems*”, includendo il controllo positivo interno (IPC) “*TaqMan Exogenous Internal Positive Control reagents*”, *Applied Biosystems*, marcato con marcatore fluorescente VIC che emette fluorescenza a $570\text{nm} < \lambda < 590\text{nm}$.

I volumi utilizzati per la preparazione della miscela di amplificazione sono riportati in Tabella 3.2.

Tabella 3.2: Volume di ciascun componente utilizzato per la preparazione della miscela di amplificazione.

Componente	Volume (µl)	
Universal Master Mix	10	x n° campioni
Primer forward (20pmol/µl)	0,5	
Primer reverse (20pmol/µl)	0,5	
Sonda (10pmol/µl)	0,5	
10x EXO IPC Mix	2	
50x EXO IPC DNA	0,5	
H2O sterile per biologia molecolare	4	

Per ciascun campione sono stati prelevati 18 µl della miscela di reazione e distribuiti in una micropiastra a 96 pozzetti.

In un'area separata, appositamente dedicata, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 2 µl di DNA del campione o del controllo positivo o 2 µl di acqua sterile

per biologia molecolare per il controllo negativo, ottenendo un volume finale di reazione di 20 μ l.

La piastra è stata sottoposta a breve centrifugazione, in modo da permettere a eventuali residui presenti sulle pareti dei pozzetti di depositarsi sul fondo ed eliminare eventuali bolle, che possono interferire con l'amplificazione o con la successiva lettura. Quindi è stata avviata la reazione di PCR *Real time*. Per la reazione di amplificazione e relativa lettura è stato utilizzato il termociclatore "7300 *Real time PCR System*", *Applied Biosystems*, il cui programma di amplificazione utilizzato è riportato in Tabella 3.3.

Tabella 3.3: Programma di amplificazione.

Step	Fase	Durata	Temperatura	n° cicli
1	Hold Ung	2 minuti	50°C	1
2	Hold di Denaturazione	10 minuti	95°C	1
3	Denaturazione	15 secondi	95°C	40
4	Annealing/polimerizzazione	60 secondi	60°C	
5	Hold- End	∞	4 °C	

Interpretazione dei risultati

Al termine dell'amplificazione il dato grezzo riportato dal *Software* è stato elaborato applicando i criteri riportati di seguito:

I campioni sono stati considerati positivi (presenza di DNA di *T. gondii*) se la curva di amplificazione presentava un Ct < 40, sono stati considerati negativi (assenza di DNA *T. gondii*) se non veniva rilevata alcuna curva di amplificazione o se la stessa presentava andamento non logaritmico o comparabile alla curva di amplificazione del controllo negativo.

3.3 Emocromo e valutazione di parametri ematochimici in animali positivi e negativi all'infezione

I campioni di sangue prelevati sono stati posti in provette con anticoagulante (EDTA) e mantenuti a 4°C fino alle successive analisi. I parametri ematologici ed ematochimici valutati ed i valori di riferimento per le specie prese in esame sono riportati in Tabella 3.4.

Tabella 3.4: Parametri ematologici ed ematochimici valutati e valori di riferimento per le specie prese in esame.

Parametri valutati	Valori di riferimento per le specie in studio		
	Equini	Bovini	Ovini
Emoglobina (g/dl)	11,0-19	8,0-15	9,0-15
Ematocrito (HCT, %)	32-53	24-46	27-45
RBC (x10 ⁶ /ml)	7,0-13	5,0-10	9,0-15
MCV (fl)	37-59	40-60	28-40
MCH (pg)	12,0-20	11,0-17	8,0-12
MCHC (g/dl)	31-39	30-36	31-34
WBC (/μl)	5400-14300	4000-12000	4000-12000
Neutrofili (maturi x10 ³ /μl)	2,26-8,58	0,6-4	0,7-6
Neutrofili (a banda /μl)	0-100	0-120	rari
Linfociti (x10 ³ /μl)	1,5-7,7	2,5-7,5	2,0-9,0
Monociti (x10 ³ /μl)	0-1,0	0,025-0,84	0-0,75
Eosinofili (x10 ³ /μl)	0-1,0	0-2,4	0-1,0
Basofili (x10 ³ /μl)	0-0,29	0-0,2	0-0,3
Piastrine (x10 ⁵ /μl)	1.0-3.5	1.0-8.0	2.5-7.5
Proteine totali (siero) (g/dl)	6,0-7,7	5,7-7,1	6,0-7,9
Glucosio (mg/dl)	60-100	35-55	30-65
LDH (U/l)	162-412		238-440

3.4 Determinazione della concentrazione di serotonina nel plasma di animali positivi e negativi all'infezione

I campioni di sangue prelevati sono stati posti in provette con anticoagulante (EDTA) e mantenuti a temperatura di refrigerazione ed al riparo dalla luce fino alle successive analisi. L'isolamento del plasma dai campioni è stato effettuato seguendo la procedura riportata di seguito:

- centrifugare il sangue a 200 g (rcf) per 10 minuti;
- prelevare il surnatante (plasma ricco di piastrine-*PRP*), centrifugare a 4500 g (rcf) per 10 minuti a 4°C;
- prelevare il surnatante (plasma povero in piastrine-*PPP*).

I livelli di serotonina nel plasma sono stati misurati mediante test ELISA, utilizzando il Kit “*Serotonin ELISA*”, *DLD Diagnostica GMBH* ed applicando il protocollo indicato dal kit. La piastra è stata agitata leggermente e si è proceduto alla lettura delle densità ottiche (OD) a $\lambda = 450$ nm, con $570 \text{ nm} < \lambda$ di riferimento < 650 nm.

Interpretazione dei risultati

I valori di densità ottica (OD) degli *Standards* e dei campioni sottoposti ad analisi sono stati letti a $\lambda = 450$ nm, con $570 \text{ nm} < \lambda$ di riferimento < 650 nm. La concentrazione della serotonina contenuta negli *Standards* 1-6 e le densità ottiche corrispondenti rilevate sono stati plottati rispettivamente sulle assi x (logaritmica) ed y (lineare) di un sistema ad assi cartesiani, in modo da ottenere la curva di taratura su grafico semilogaritmico.

La concentrazione di serotonina degli *Standards* 1-6 ed il *range* di concentrazione per i controlli 1 e 2 sono riportati in Tabella 3.5.

Tabella 3.5: Concentrazione di serotonina degli Standards e *range* di concentrazione dei controlli forniti dal Kit ELISA.

Standard	Concentrazione serotonina (ng/ml)	Controllo	Range concentrazione serotonina (ng/ml)
1	0	1	64-134 ng/ml
2	15	2	226-468 ng/ml
3	50		
4	150		
5	500		
6	2500		

La concentrazione dei campioni di plasma è stata ricavata riportando il valore di densità ottica corrispondente sulla curva e dividendo il valore così ottenuto per 1,8. Di seguito vengono riportati i criteri di validazione del Test, necessari per accettare i risultati:

- la curva standard deve avere andamento semilogaritmico, con andamento decrescente delle densità ottiche all'aumentare della concentrazione di serotonina corrispondente;
- $(ODS_1 - ODS_6) \geq 1,6$.

In Figura 3.1 viene riportato un modello di riferimento per la curva Standard attesa, tratto dal manuale d'uso del kit.

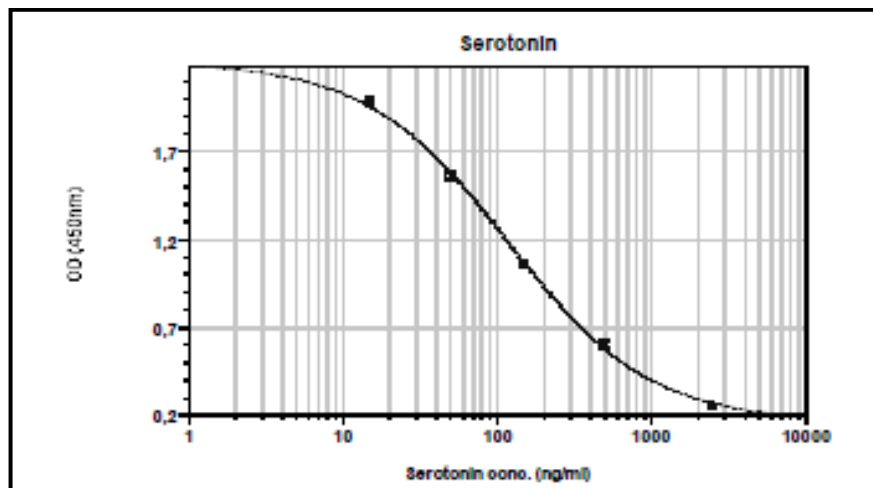


Figura 3.1: Modello di riferimento per la curva Standard attesa.

3.5 Analisi dei profili d'espressione di proteine chiave delle risposte immunitarie o ipoteticamente correlate alla toxoplasmosi in animali positivi e negativi all'infezione

Mediante ricerca bibliografica sono state individuate una serie di molecole potenzialmente correlate alla risposta dell'ospite alle infezioni da *T. gondii*. Mediante l'uso di *softwares* bioinformatici sono stati progettati i *primers* specifici per lo studio dei profili d'espressione di ciascuna molecola nelle diverse specie in esame. Successivamente sono stati prelevati i campioni da sottoporre ad analisi, dai quali è stato estratto l'RNA totale, quantizzato, retrotrascritto in cDNA e processato mediante PCR *Real-time*, per la valutazione dei livelli d'espressione relativi alle molecole di mRNA di interesse.

3.5.1 Progettazione dei *primers*

I *primers* utilizzati per le analisi descritte sono stati progettati mediante il procedimento riportato di seguito:

- ricerca in banca dati (Gene bank NCBI) delle sequenze di mRNA per i geni oggetto di studio nelle diverse specie ed annotazione delle regioni codificanti (CDS);
- allineamento multiplo delle sequenze di mRNA codificante per ciascuna proteina nelle diverse specie animali oggetto di studio, mediante l'utilizzo del software bioinformatico "*Clustal W2 Multiple Sequence Alignment*";
- distinzione delle regioni introniche ed esoniche di ciascun gene di riferimento, mediante il software bioinformatico "*Gene Structure display server*".

La procedura riportata ha permesso di identificare per ciascun gene una coppia di *primers* lunghi circa 20 nucleotidi, con contenuto in GC di circa il 50 % e Tm comparabili. Inoltre per ciascuna coppia di *primers* almeno uno dei due ricade nelle regioni di giunzione esone-esone e tutti ricadono all'interno delle regioni di omologia nelle quattro specie oggetto di analisi, in modo da poter utilizzare la stessa coppia di *primers* per campioni provenienti da specie diverse, mantenendo costanti le condizioni di amplificazione. Un'ulteriore verifica dell'adeguatezza dei *primers* progettati è stata effettuata mediante allineamento in BLAST delle sequenze dei due *primers* e di tutti i prodotti di sequenziamento disponibili in banca dati, in modo da escludere che gli stessi non si allineassero con regioni non specifiche di altri geni.

3.5.2 Prelievo, preparazione e conservazione dei campioni

Le analisi previste dal progetto sono state effettuate su sezioni di diversi tessuti dell'ospite soggetti all'azione del parassita nel corso dell'infezione. I

profili d'espressione di ciascuna delle molecole oggetto di studio sono stati analizzati in campioni differenti, scelti in base alla funzione specifica svolta da ciascuna molecola considerata. In Tabella 3.6 sono elencate le molecole oggetto di studio ed i campioni analizzati per ciascuna di esse.

Tabella 3.6: Molecole oggetto di studio e tessuti dell'ospite analizzati.

Molecola	Campione analizzato		
	Muscolo striato	t. encefalico	duodeno
HIF1 alfa	x	x	x
PHD2	x	x	x
Pten	x	x	x
PI3K	x	x	x
Akt1	x	x	x
MEK3	x	x	x
Nod-2	x	x	x
β -actina	x	x	x

Per ciascuna specie in esame sono stati prelevati campioni di sangue intero (da animali vivi in allevamento e da animali macellati) in provette con anticoagulante (EDTA) e sezioni di intestino (duodeno), tessuto muscolare striato ed encefalico (tronco encefalico) da animali macellati. Le sezioni di tessuto sono state poste in contenitori sterili contenenti *RNA Later Solution*.

Tutti i campioni prelevati sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione e le sezioni di tessuti in *RNA Later solution* sono state conservate a -20°C fino alle successive lavorazioni.

3.5.3 Estrazione dell'RNA

I campioni sono stati scongelati e sottoposti ad estrazione dell'RNA. Tutti i passaggi descritti sono stati effettuati utilizzando tubi e puntali sterili *RNAse free*. L'RNA è stato isolato mediante estrazione su colonna, con l'utilizzo del "PureLink RNA mini Kit", *Ambion*.

Tutti i campioni sono stati processati mediante l'applicazione del protocollo indicato dal kit. Tuttavia, prima di avviare le procedure previste dal progetto, è stata effettuata l'ottimizzazione delle stesse, testando diverse soluzioni di lisi, differenti volumi di H₂O *RNAse free* e Proteinasi K, ed applicando tempi di digestione differenti. In questo modo sono state selezionate le condizioni ottimali per ottenere da ciascuna matrice una resa di estrazione migliore con il minore utilizzo di reagenti.

Le sezioni di muscolo striato ed intestino sono state trattate secondo il protocollo riportato di seguito:

- prelevare 30 mg (cubo di 3mm di lato) di tessuto;
- aggiungere 1 ml di Buffer di Lisi addizionato di β-mercaptoetanolo all'1%;
- frammentare mediante l'uso di un pestello sotto cappa chimica, mantenendo il tubo in ghiaccio;
- lisare mediante l'uso di una pipetta;
- aggiungere 590 µl di H₂O *RNAse free* e Proteinasi K (10 µl per i campioni di muscolo, 20 µl per i campioni di intestino) ed incubare a 55°C overnight.

Per le sezioni di tronco encefalico, dal momento che contengono una elevata percentuale di lipidi, il Buffer di lisi fornito dal Kit è stato sostituito con il *QIazol Lysis reagent*, che ha permesso di isolare un maggior quantitativo di RNA. La procedura applicata è riportata di seguito:

- prelevare 100 mg (3 x cubo di 3mm di lato) di tessuto;

- aggiungere 1 ml di *QIazol Lysis Reagent* addizionato di β mercaptoetanolo all'1%;
- frammentare mediante l'uso di un pestello sotto cappa chimica, mantenendo il tubo in ghiaccio;
- lisare mediante l'uso di una pipetta;
- aggiungere 590 μ l di *H₂O RNase free* e 20 μ l di *Proteinasi K* ed incubare a 55°C per almeno 5 h o overnight.

Dopo la fase di digestione tutti i campioni sono stati trattati secondo il medesimo protocollo, indicato nel kit.

3.5.4 Retrotrascrizione in cDNA e *Real-time PCR*

L'RNA estratto dai campioni è stato quantizzato mediante lettura spettrofotometrica (Qubit) e trattato con *DNAsi I* in modo da eliminare gDNA contaminante presente nel campione, secondo la procedura riportata di seguito:

- aggiungere 1 μ l di *DNAsi I 10X* per 80 μ g di RNA (V_{\max} RNA= 8 μ l);
- aggiungere *H₂O RNase free* fino ad un $V_f=10$ μ l;
- incubare a temperatura ambiente per 15 minuti;
- aggiungere 1 μ l di *EDTA 25 mM* ed incubare a 65°C per 10 minuti, in modo da inattivare l'enzima *DNAsi*.

L'RNA è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando il kit "*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*", *Applied Biosystems*.

I volumi utilizzati per la preparazione della miscela di retrotrascrizione sono riportati in Tabella 3.7.

Tabella 3.7: Volume di ciascun componente utilizzato per la preparazione della miscela di retrotrascrizione.

Componente	Volume (μl)	
10X RT Buffer	2	x n° campioni
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8	
10X RT Random Primers	2	
MultiScribe Reverse Transcriptase	1	
H ₂ O Nuclease-free	4,2	

Per ciascun campione sono stati prelevati 10 μl della miscela di reazione e posti in tubi sterili *RNAse free* da 0,2 ml. Mantenendo le provette in ghiaccio, a ciascuna provetta sono stati aggiunti 10 μl di RNA del campione, ottenendo un volume finale di reazione di 20 μl . Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato il termociclatore *One-Advanced, CelBio EuroClone*. Il programma di retrotrascrizione applicato è riportato in Tabella 3.8.

Tabella 3.8: Programma di retrotrascrizione.

Step	Durata	Temperatura
1	10 minuti	25°C
2	120 minuti	37°C
3	5 minuti	85°C
5	∞	4 °C

I campioni di cDNA ottenuti sono stati quantizzati ed eventualmente diluiti con H₂O per biologia molecolare, in modo da riportare tutti i campioni di DNA alla stessa concentrazione di partenza. Gli stessi sono stati successivamente conservati a -20°C fino alle successive lavorazioni o processati immediatamente mediante *Real-time PCR*.

Per la procedura di *Real-time PCR* è stato utilizzato il kit “*PowerUp Sybr green Master Mix*”, *Applied biosystems*. I volumi utilizzati per la preparazione

delle miscele di *Real-time PCR* specifiche per ciascuna molecola oggetto di studio sono riportati in Tabella 3.9.

Tabella 3.9: Volume di ciascun componente utilizzato per la preparazione della miscela di *Real-time PCR* per ciascuna molecola in studio.

Componente	Volume (μl)	
2X PowerUp Sybr green Master Mix	10	x n° campioni
Forward Primer (20 μM)	0,7	
Reverse Primer (20 μM)	0,7	
H₂O Nuclease-free	3,6	

Per ciascun campione sono stati prelevati 15 μl della miscela di reazione e distribuiti nel pozzetto corrispondente di una micropiastra a 96 pozzetti.

In un'area separata appositamente dedicata a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 2,5 μl di cDNA a $C_i = 0,8 \text{ ng}/\mu\text{l}$, ottenendo un volume finale di reazione di 20 μl .

La piastra è stata sottoposta a breve centrifugazione, in modo da permettere ad eventuali residui presenti sulle pareti dei pozzetti di depositarsi sul fondo ed eliminare eventuali bolle, che possono interferire con l'amplificazione o con la successiva lettura, quindi è stata avviata la reazione di *PCR Real time*. Per la reazione di *Real-time PCR* e relativa lettura è stato utilizzato il Termociclatore "*Line Gene 9660*", *Bioer* ed il programma di *Real-time PCR* impiegato è riportato in Tabella 3.10.

Tabella 3.10: Programma di *Real-time PCR*.

Step	Fase	Durata	Temperatura	n° cicli
1	UDG activation	2 minuti	50°C	1
2	Dual-Lock DNA polymerase	2 minuti	95°C	1
3	Denaturazione	15 secondi	95°C	40
4	Annealing/polimerizzazione	60 secondi	60°C	
5	Hold-end	∞	4 °C	

Interpretazione dei risultati

Al termine dell'amplificazione il dato grezzo riportato dal software è rappresentato dai valori di C_t o ciclo di *threshold* misurati per l'mRNA di ciascuna molecola nel tessuto o matrice specifici considerati. Tali dati sono stati elaborati mediante quantizzazione relativa, applicando il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [Livak K. J. & Schmittgen T. D., 2001] come riportato di seguito:

- il valore di C_t di ciascuna molecola analizzata viene normalizzato rispetto al C_t del gene *housekeeping* (β actina) applicando la formula riportata di seguito:

$$\Delta C_t = C_t \text{ campione} - C_t \text{ mRNA } housekeeping$$

- viene calcolata la media dei ΔC_t per ciascun gruppo di valori da comparare;
- viene scelto il calibratore interno, ossia il gene meno espresso tra quelli considerati (con il valore di ΔC_t più alto) e viene calcolato il valore di $\Delta\Delta C_t$, secondo la formula riportata di seguito:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_t \text{ mRNA calibratore}$$

3 | *Materiali e metodi*

Infine, calcolando i valori di $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ed il $\log_{10}(2^{-\Delta\Delta Ct})$ i livelli d'espressione di ciascuna molecola sono espressi come valori normalizzati rispetto al gene *housekeeping* ed in forma di indici numerici che indicano quanto ciascun gene è più espresso nel tessuto o campione rispetto a quello scelto come calibratore.

RISULTATI

4.1 Parametri ematochimici e concentrazione di serotonina plasmatica

L'analisi dei parametri ematochimici è stata effettuata su campioni di sangue prelevati presso allevamenti di ovini, bovini ed equini. Il numero di campioni per ciascuna specie, nei quali sono stati valutati i parametri ematochimici di interesse e l'area di provenienza dei campioni sono riportati in Tabella 4.1.

Tabella 4.1: Numero di campioni analizzati per ciascuna specie ed area di provenienza degli animali.

Specie	n° campioni	provenienza	Totale
Ovini	57	Catania	57
Bovini	43	Catania	43
Equini	13	Ragusa	66
	53	Catania	

Mediante i metodi sierologici descritti in “Materiali e metodi”, è stata valutata la positività o negatività di ciascun campione all'infezione da *T. gondii*, in particolare su 57 ovini 17 sono risultati positivi alla Toxoplasmosi e 40 sono risultati negativi, su 43 bovini 2 sono risultati positivi alla Toxoplasmosi e 41 sono risultati negativi, su 66 equini 3 sono risultati positivi alla Toxoplasmosi e 63 sono risultati negativi. Di seguito sono riportati i valori di media e deviazione standard calcolati per ciascuno dei parametri ematochimici valutati nelle specie ovina (Tabella 4.2), bovina (Tabella 4.3) ed equina (Tabella 4.4). Sui dati riportati è stata effettuata l'analisi statistica, mediante applicazione del Test t di Student per dati non appaiati. I parametri la cui variazione tra i due gruppi è risultata

statisticamente significativa sono evidenziati in grigio, il valore di significatività è indicato dagli asterischi.

Tabella 4.2: Parametri ematochimici valutati nei campioni di specie ovina.

	Ovino	Toxo +		Toxo -	
		Media	DS	Media	DS
Emoglobina (g/dl)	9,0-15	11,193529	1,5378757	10,4528	0,8258709
Ematocrito (HCT, %)	27-45	33,537059	4,5231043	31,610385	2,5302735
RBC (x10⁶/ml)	9,0-15	10,159412	0,998433	9,9807692	0,8267959
MCV (fl)	28-40	32,977059	2,4479603	31,984615	2,7306457
MCH (pg)	8,0-12	10,98	0,9946796	10,511154	0,8713545
MCHC (g/dl)	31-34	32,761176	0,8652231	33,254808	1,094684
Reticolociti (%RBC)	0	0	0	0	0
WBC (n/μl)	4000-12000	8232,1176	2170,3724	8245	1569,935
Neutrofilii (maturi x10³/μl)	0,7-6	3,4038235	1,3943878	2,8438462	1,07125
Linfociti (x10³/μl)	2,0-9,0	4,2	1,707758	4,5515385	1,8504523
Monociti (x10³/μl)	0-0,75	0,460529	0,332099	0,1881154	0,1295405
Eosinofili (x10³/μl)	0-1	0,5232353	0,3335533	0,5527692	0,2120733
Basofili (x10³/μl)	0-0,3	0,0375882	0,0355494	0,0274231	0,0272047
Piastrine (x10⁵/μl)	2,5-7,5	5,6523529	1,1675002	5,7261538	1,4825089
Proteine totali (siero) (g/dl)	6,0-7,9	7,997059	0,779517	7,364	0,4412628
LDH (U/l)	238-440	433,33294	109,9669	428,84846	47,596527
Glucosio (mg/dl)	30-65	39,5	7,6731675	45,955	7,740486

Toxo + → Positivo alla Toxoplasmosi

Toxo - → Negativo alla Toxoplasmosi

** = p < 0,01

*** = p < 0,001

Tabella 4.3: Parametri ematochimici valutati nei campioni di specie bovina.

	Bovino	Toxo +		Toxo -		
		Media	DS	Media	DS	
Emoglobina (g/dl)	8,0-15	11,185	2,142534	10,38829	1,633028	
Ematocrito (HCT, %)	24-46	29,5	5,091169	28,09146	3,45477	
RBC (x10 ⁶ /ml)	5,0-10	6,39	1,92333	6,174073	1,079673	
MCV (fl- femtolitri)	40-60	47,65	8,555992	48,10976	4,700748	
MCH (pg)	11,0-17	18	2,828427	17,93659	1,970629	
MCHC (g/dl)	30-36	37,9	0,848528	38,07073	2,969364	
Reticolociti (%RBC)	0	0	0	0	0	
WBC (/μl)	4000-12000	13680	4695,19	7606,341	1787,073	***
Neutrofili (maturi x10 ³ /μl)	0,6-4	5,365	1,88798	2,462927	0,968422	***
Neutrofili (a banda /μl)	0-120	0	0	0	0	
Linfociti (x10 ³ /μl)	2,5-7,5	3,8	1,796051	4,02122	1,170073	
Monociti (x10 ³ /μl)	0,025-0,84	0,5105	0,057276	0,597317	0,132859	
Eosinofili (x10 ³ /μl)	0-2,4	1,2415	1,638366	0,470878	0,358757	
Basofili (x10 ³ /μl)	0-0,2	0,0465	0,009192	0,05222	0,02657	
Piastrine (x10 ⁵ /μl)	1,0-8,0	4,425	1,78898	3,676098	1,531257	

Toxo + → Positivo alla Toxoplasmosi

Toxo - → Negativo alla Toxoplasmosi

*** = p < 0,001

Tabella 4.4: Parametri ematochimici valutati nei campioni di specie equina.

	Equino	Toxo +		Toxo -		
		Media	DS	Media	DS	
Emoglobina (g/dl)	11,0-19	10,7667	2,58134	13,59662	1,719234	**
Ematocrito (HCT, %)	32-53	28,4	7,09295	36,55823	4,366225	**
RBC (x10 ⁶ /ml)	7,0-13	6,04667	1,38385	7,480197	1,37466	
MCV (fl- femtolitri)	37-59	46,83333	2,138535	49,52652	3,841045	
MCH (pg)	12,0-20	17,76667	0,64291	18,584	1,425806	
MCHC (g/dl)	31-39	37,96667	0,51316	37,55424	0,76014	
Reticolociti (%RBC)	0	0	0	0	0	
WBC (/μl)	5400-14300	9830	275,136	7267,395	2432,336	
Neutrofili (maturi x10 ³ /μl)	2,26-8,58	4,57	0,825409	4,536061	1,195284	
Neutrofili (a banda /μl)	0-100	0	0	0	0	
Linfociti (x10 ³ /μl)	1,5-7,7	2,923333	0,531445	2,359303	1,069858	
Monociti (x10 ³ /μl)	0-1,0	1,523333	0,275379	0,38114	0,17766	***
Eosinofili (x10 ³ /μl)	0-1,0	0,427333	0,191745	0,408394	0,29442	
Basofili (x10 ³ /μl)	0-0,29	0,06133	0,01901	0,014606	0,014653	***
Piastrine (x10 ⁵ /μl)	1,0-3,5	2,067	1,244571	2,511197	1,505997	
Proteine totali (siero) (g/dl)	6,0-7,7	5,9	0,1	6,58413	0,48133	*
LDH (U/l)	162-412	373,6667	6,350853	341,0781	62,98256	
Glucosio (mg/dl)	60-100	71,9	1,946792	74,69875	9,434821	

Toxo + → Positivo alla Toxoplasmosi

Toxo - → Negativo alla Toxoplasmosi

*** = p < 0,001

I livelli di serotonina contenuti nel plasma dei campioni prelevati sono stati valutati mediante il protocollo riportato in “Materiali e metodi”. I campioni analizzati corrispondono a quelli nei quali sono stati valutati i parametri ematochimici. Per ogni ELISA effettuata, sono stati processati anche gli *standards* forniti dal kit, secondo il protocollo di riferimento. I valori di OD ottenuti per gli *standards* sono stati utilizzati per l’extrapolazione della curva semilogaritmica di riferimento. Riportando su di essa i valori di OD misurati per ciascun campione di plasma è stata ricavata la concentrazione di serotonina contenuta negli stessi. I valori di media e deviazione standard calcolati per ciascun gruppo sono riportati nell’istogramma in Figura 4.1. Sui valori ottenuti è stata effettuata l’analisi statistica, mediante applicazione del Test t di Student per dati non appaiati. I parametri la cui variazione tra i due gruppi è risultata statisticamente significativa sono indicati dagli asterischi.

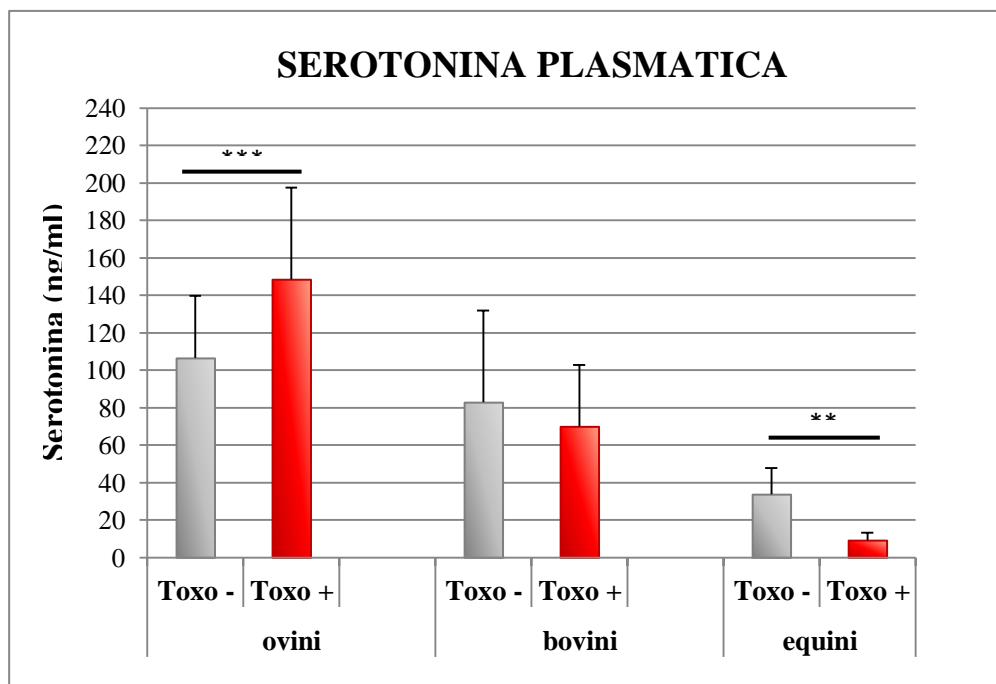


Figura 4.1: Livelli di serotonina contenuta nel plasma di campioni positivi e negativi alla Toxoplasmosi per ciascuna specie oggetto di studio.

4.2 Profili d'espressione

L'analisi dei profili d'espressione è stata effettuata su sezioni di tessuti prelevate post-mortem da animali sottoposti a macellazione, di specie suina, ovina, bovina ed equina. I campionamenti sono stati effettuati presso diversi macelli delle province di Catania e Ragusa. Il numero di campioni considerati per ciascuna specie e la sede di campionamento sono riportati in Tabella 4.5.

Tabella 4.5: Numero di campioni per ciascuna specie e sedi dei campionamenti.

Specie	n° campioni	Provenienza
Suini	15	Macello "Jannarello"- Paternò (CT)
Ovini	10	Centro Carni Srl- Modica (RG)
Bovini	15	Spadola & Figli Srl- Ragusa (RG)
Equini	11	Macello "Jannarello"- Paternò (CT)

Per ciascun animale oggetto di campionamento è stata valutata la positività o negatività alla Toxoplasmosi mediante metodo sierologico, nonché l'eventuale presenza di cisti in diverse sezioni di tessuti *target*, mediante ricerca diretta del DNA parassitario. L'esito dei test effettuati per ciascuna specie è riportato in Tabella 4.6.

Tabella 4.6: Esito dei test diagnostici applicati.

Specie	Esito test sierologico		Matrice tessuto					
			Mus. Schel.	Diaf.	Mus. card.	Enc.	B. ocul.	Int.
Suini	Toxo +	12	0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
	Toxo -	3	0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	
Ovini	Toxo +	6		0	0	0		0
	Toxo -	4		0	0	0		0
Bovini	Toxo +	0		0	0	0		0
	Toxo -	15		0	0	0		0
Equini	Toxo +	0		0	0	0		0
	Toxo -	11		0	0	0		0

Abbreviazioni: **Mus. Schel.** – Muscolo scheletrico, **Diaf.**- Diaframma, **Mus. Card.**- Muscolo cardiaco, **Enc.**- Encefalo, **B. ocul.**- Bulbo oculare, **Int.**- Intestino.

Toxo+ → Positivo alla Toxoplasmosi, **Toxo-** → Negativo alla Toxoplasmosi

0 → tessuto analizzato, negativo; **0** → tessuto analizzato, positivo.

Dai campioni conservati in *RNA Later* è stato estratto l'RNA totale, che è stato quindi retrotrascritto in cDNA e processato mediante *Real time PCR*. I protocolli applicati sono riportati in “Materiali e metodi”. Tutti i campioni di cDNA sono stati diluiti adeguatamente, al fine di utilizzare concentrazioni equivalenti per ciascuna reazione di amplificazione. Inoltre, prima di procedere con lo studio dei profili d'espressione, sul cDNA è stata effettuata una PCR

utilizzando i *primers* progettati, ed i prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'Agarosio, al fine di verificare che ciascuna coppia di *primers* generasse una sola banda all'altezza del prodotto di amplificazione atteso ed escludere l'amplificazione di regioni aspecifiche.

I valori di Ct ottenuti per ciascun campione sono stati normalizzati rispetto al valore di Ct ottenuto per lo stesso campione, utilizzando i *primers* specifici per l'mRNA codificante per la β -actina. Per ciascuna analisi di comparazione è stato scelto un calibratore interno, ossia la molecola meno espressa tra quelle da analizzare. Rispetto ad esso sono stati calcolati i valori di $\Delta\Delta Ct$, $2^{\Delta\Delta Ct}$ e $\log_{10}(2^{\Delta\Delta Ct})$ ed i valori di media e deviazione standard ottenuti per ciascun gruppo di dati sono stati riportati in grafico. Poiché i gruppi di campioni avevano ridotta numerosità, per gli stessi è stata valutata la distribuzione dei dati, mediante l'applicazione del metodo di Kolmogorov-Smirnov. Dal momento che i valori ottenuti presentavano distribuzione gaussiana, è stato possibile effettuare l'analisi statistica mediante test t di Student. Di seguito vengono riportati gli istogrammi relativi ai valori risultati statisticamente significativi.

4.2.1 HIF1 α e PHD2

Come descritto in precedenza, HIF è un sensore cellulare dell'ipossia. In condizioni di normossia le proteine PHD mantengono idrossilati due residui di prolina di HIF1 α , guidandone la degradazione mediante il sistema ubiquitina-proteasoma. In condizioni di ipossia invece questa subunità migra a livello nucleare, dove forma un complesso attivo con la subunità β ed agisce da regolatore dell'espressione genica. Mediante studi in vitro, effettuati su fibroblasti umani in coltura, è stato osservato che in condizioni di normossia, *T. gondii* stabilizza HIF1 α attraverso una diminuzione dei livelli di mRNA codificante per PHD2 e che tale fenomeno è necessario per la moltiplicazione del parassita all'interno della cellula ospite [Wiley M. *et al.*, 2010]. Sulla base dei dati descritti è stata effettuata una valutazione dei livelli di mRNA codificante per PHD2, al fine di confermare tale osservazione in organismi animali naturalmente infettati e,

dal momento che il parassita agisce stabilizzando HIF e non ne altera i livelli di espressione [Wiley M. *et al.*, 2010], è stata effettuata una comparazione dei livelli di mRNA codificante per tale molecola in animali sani delle specie animali oggetto di studio, in modo da valutare se a livello fisiologico vi sia una differenza nei suoi livelli d'espressione tra le diverse specie animali. Una diminuzione significativa di PHD2 in animali positivi alla Toxoplasmosi è stata osservata nella specie ovina solamente a livello intestinale (Figura 4.2) mentre non è stata rilevata alcuna significativa variazione nei tessuti muscolare ed encefalico di specie ovina e suina (grafico non riportato).

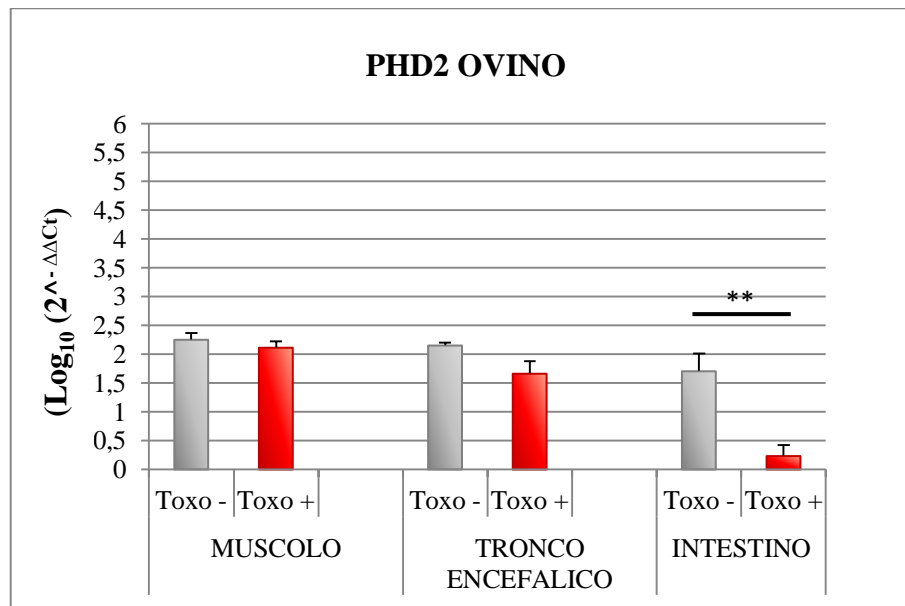


Figura 4.2: Variazione dei livelli di espressione di PHD2 tra ovini sani ed infetti. Calibratore interno: PHD2 intestino ovini infetti.

I risultati delle analisi comparative sui livelli di espressione fisiologici di HIF1 α e PHD2 nelle diverse specie animali sono riportati negli istogrammi in Figura 4.3 e 4.4. I dati sono stati considerati significativi per $p < 0,01$, la significatività è indicata da un asterisco.

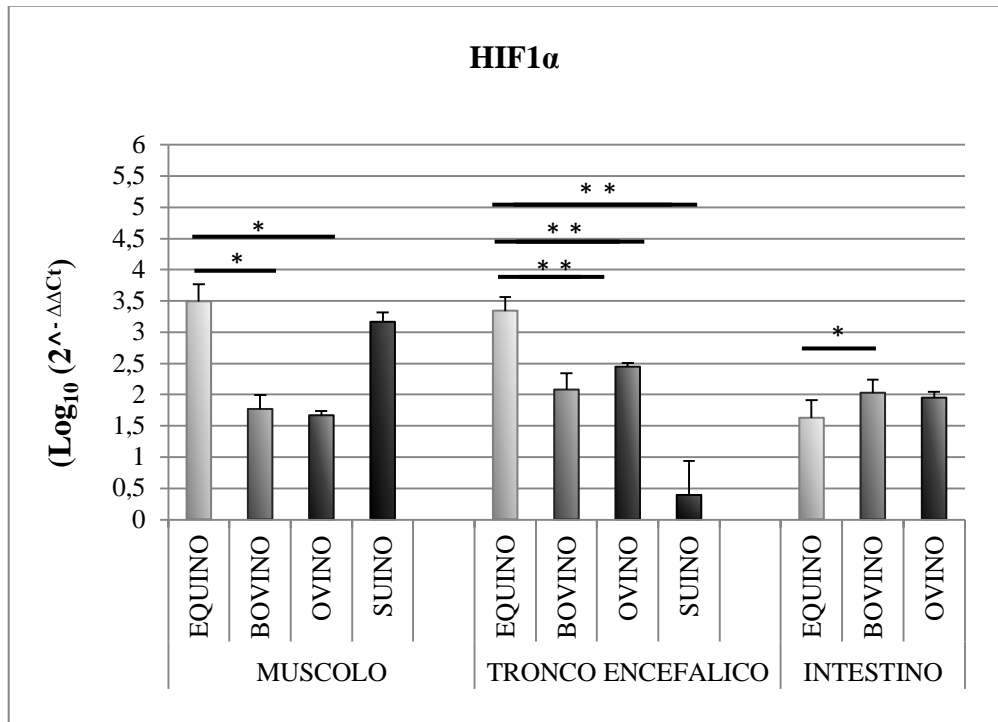


Figura 4.3: Analisi comparata dei livelli fisiologici di espressione di HIF1α. Calibratore interno: tronco encefalico suino.

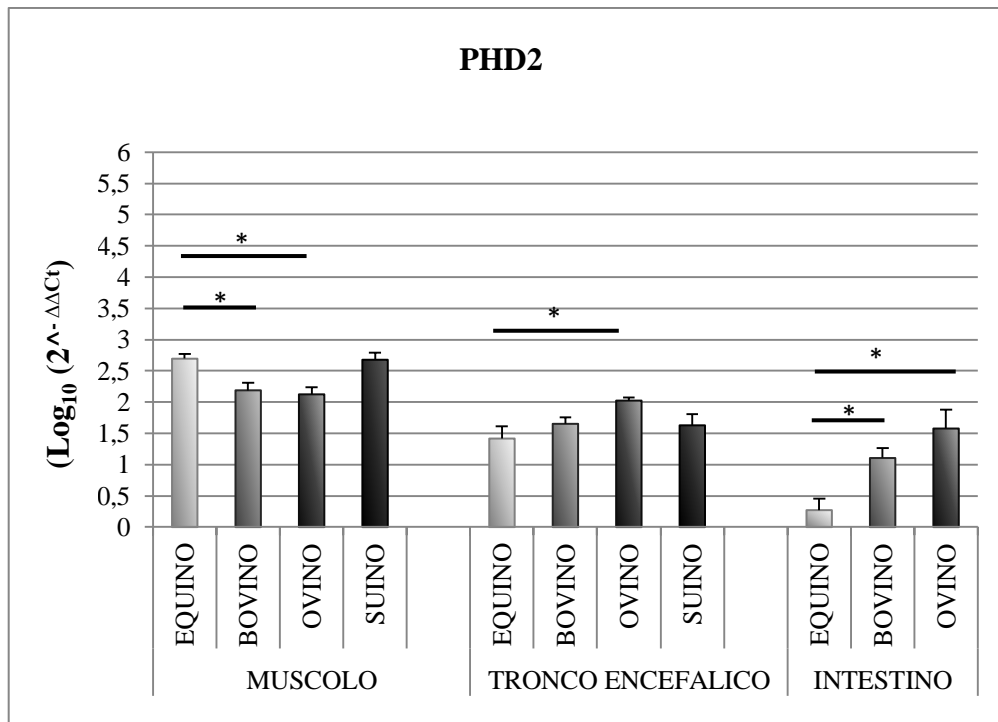


Figura 4.4: Analisi comparata dei livelli fisiologici di espressione di PHD2. Calibratore interno: intestino equino.

Dall'osservazione dei grafici risultano livelli fisiologici del mRNA codificante per entrambe le proteine più elevati nel tessuto muscolare degli equini rispetto a bovini ed ovini, a livello intestinale gli equini presentano livelli più bassi di mRNA codificante per HIF1 α rispetto ai bovini e di mRNA codificante per PHD2 rispetto a bovini ed ovini. Solamente a livello del tronco encefalico gli equini presentano livelli di mRNA codificante per HIF1 α più elevati rispetto alle altre specie, mentre i livelli di mRNA codificante per PHD2 risultano inferiori rispetto agli ovini e comparabili rispetto a quelli rilevati in bovini e suini. Valutando i due parametri insieme, risulta evidente come gli equini presentino tanto a livello del tessuto muscolare che dell'intestino profili di espressione simili alle altre specie, con livelli di mRNA codificante per HIF1 α inferiori rispetto a quelli di mRNA codificante per PHD2, mentre a livello del tronco encefalico i livelli di HIF1 α risultano comparabili rispetto ai livelli di PHD2 soltanto negli equini. Nell'istogramma in figura 4.5 viene rappresentata l'analisi comparata di tali parametri tra equini e bovini, dal momento che ovini e suini presentano profili di espressione comparabili ai bovini.

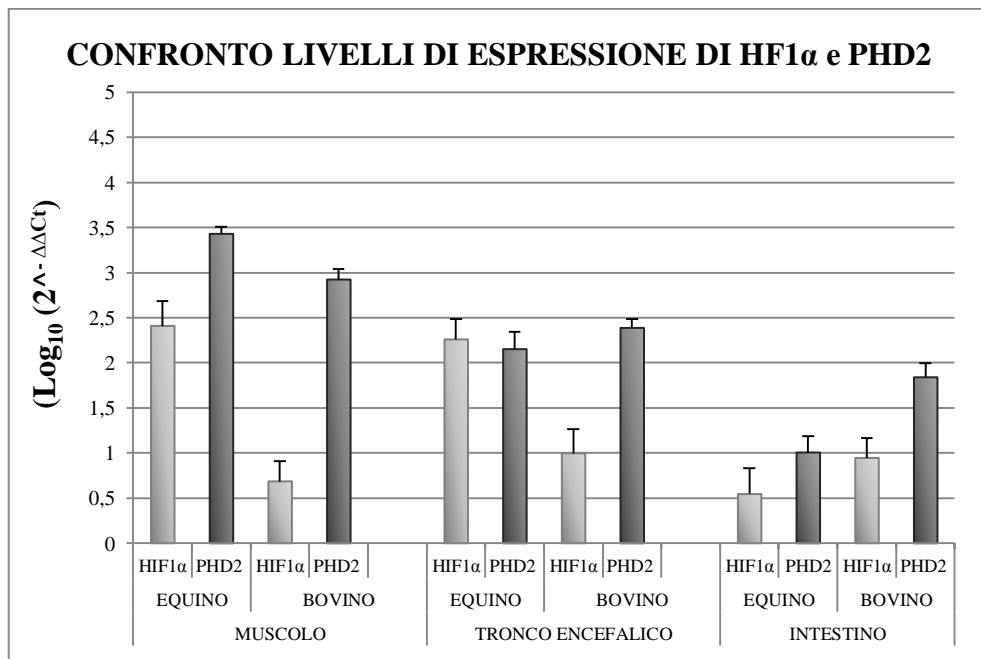


Figura 4.5: Confronto dei livelli d'espressione di HIF1 α e di PHD2 in equini e bovini. Calibratore interno: HIF1 α intestino equino.

4.2.2 PTEN, PI3K ed AKT1

PTEN, PI3K ed AKT1 intervengono nella modulazione di diverse funzioni cellulari, con funzione inibitoria della prima proteina e stimolatoria della seconda rispetto alla terza. Di seguito vengono riportati gli istogrammi raffiguranti l'analisi comparata dell'espressione delle tre molecole in ovini e suini. I livelli di significatività per la variazione di tali parametri tra animali positivi e negativi alla Toxoplasmosi sono indicate dagli asterischi.

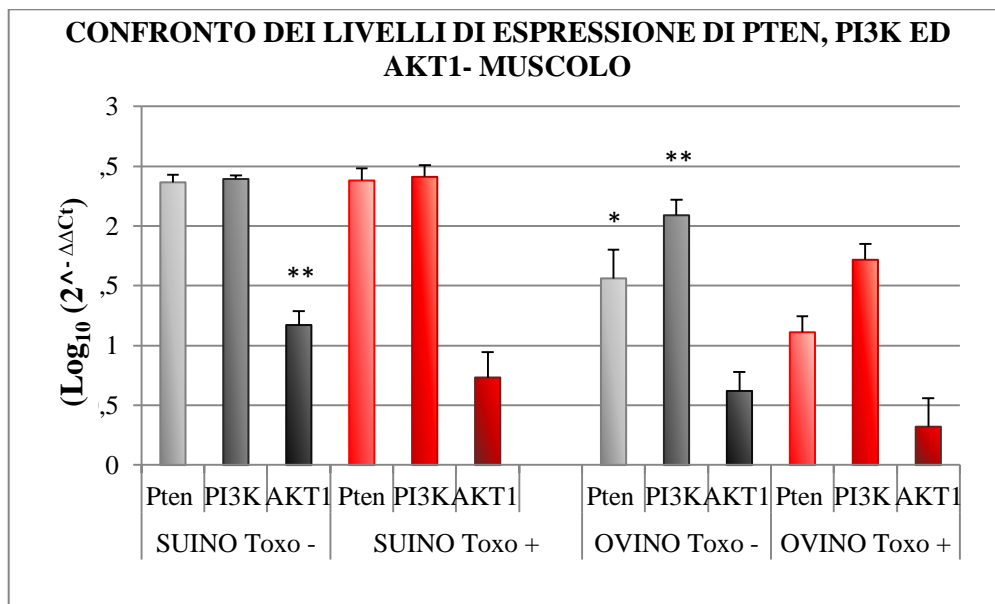


Figura 4.6: Confronto dei livelli di espressione di PTEN, PI3K ed AKT1 tra animali sani ed infetti di specie ovina e suina. Calibratore interno: AKT1 ovini sani.

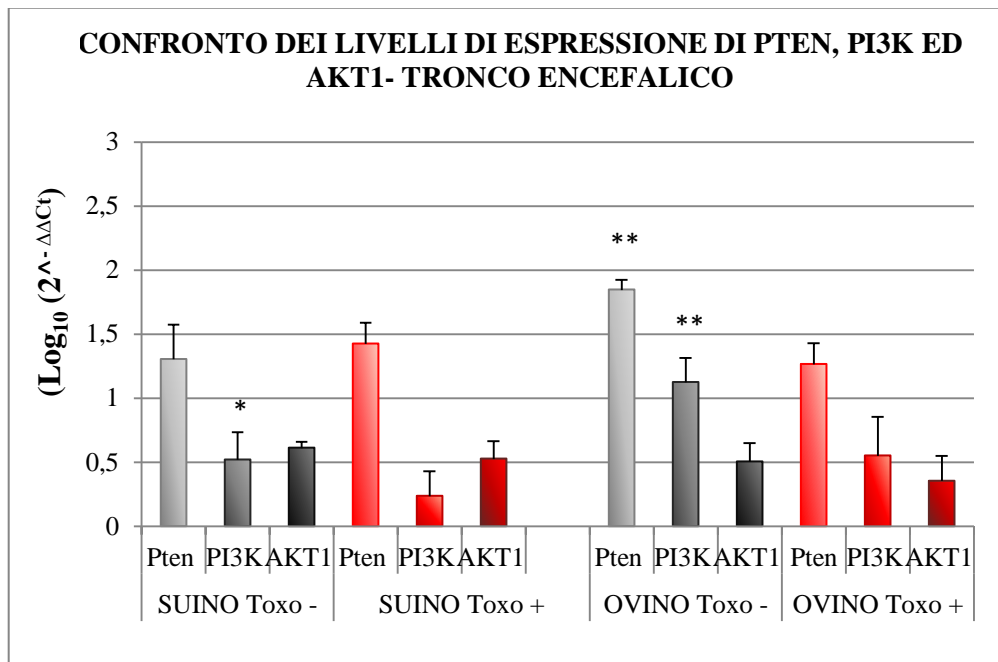


Figura 4.7: Confronto dei livelli di espressione di PTEN, PI3K ed AKT1 tra animali sani ed infetti di specie ovina e suina. Calibratore interno: PI3K suini infetti.

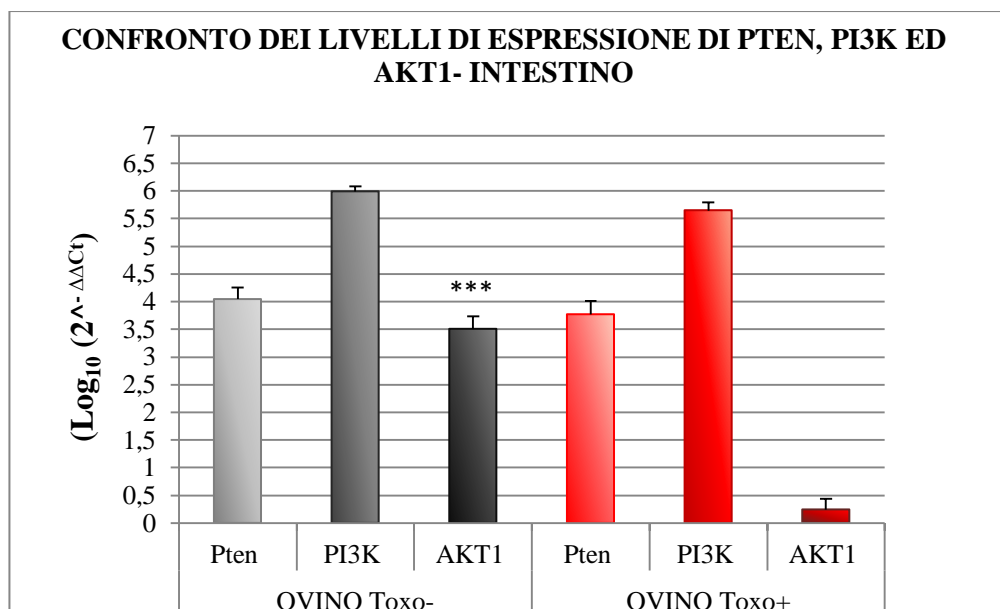


Figura 4.8: Confronto dei livelli di espressione di PTEN, PI3K ed AKT1 tra animali sani ed infetti di specie ovina. Calibratore interno: PI3K ovini sani.

In particolare, nei suini infetti sono stati osservati livelli di AKT1 più bassi rispetto al gruppo controllo, con livelli comparabili di PTEN e PI3K nel tessuto muscolare. Nel tronco encefalico dei suini infetti sono stati rilevati livelli di PI3K più bassi rispetto al gruppo controllo, livelli invariati di PTEN e AKT1, con i primi superiori rispetto ai secondi. Negli ovini infetti sono stati osservati livelli più bassi di mRNA codificante per PTEN e PI3K rispetto al gruppo controllo tanto a livello muscolare che encefalico. Tuttavia a livello muscolare i livelli di PTEN sono inferiori rispetto a PI3K, ma superiori rispetto ad AKT1, invece a livello del tronco encefalico i livelli di PTEN sono superiori sia rispetto a PI3K che ad AKT1. A livello intestinale gli ovini infetti presentano livelli inferiori di AKT1 rispetto al gruppo controllo e livelli invariati degli altri due mRNA, con livelli di PTEN inferiori rispetto a PI3K. I livelli di PTEN, quindi, risultano preponderanti rispetto alle altre due molecole solamente a livello del tronco encefalico. Tuttavia non si osserva netto aumento di PTEN piuttosto che PI3K o AKT1 nei tessuti di animali infetti rispetto ai sani, bensì una diminuzione solamente di AKT1 o di PTEN e PI3K. Inoltre dal momento che sono state identificate numerose molecole a valle rispetto alle tre considerate, sarebbe utile nella comprensione di questo *pathway* associare alle analisi effettuate lo studio anche di altre molecole più a valle, per comprendere come gli equilibri descritti influiscano su di esse.

4.2.3 MEK3

Come descritto precedentemente, MEK3 è una proteina chinasi che interviene nei *pathways* di regolazione di meccanismi quali crescita e differenziazione cellulare, nonché di risposta ad ormoni, citochine e stress. L'interesse per la valutazione dei livelli d'espressione della molecola era legato principalmente all'osservazione di una sua inibizione in cellule nervose umane in fase acuta di infezione da *T. gondii* in vitro [Xiao J. *et al.*, 2014]. Questo risultato ha suggerito di verificare che la stessa osservazione potesse essere fatta in animali di altre specie, naturalmente infettati, e non esclusivamente o necessariamente in fase acuta. I tessuti muscolare ed intestinale sono stati inclusi nelle analisi come campioni di controllo, per i quali non erano disponibili dati bibliografici, e quindi non era stata formulata alcuna particolare ipotesi. Dai risultati ottenuti, rappresentati nei due istogrammi in figura 4.9 e 4.10, tuttavia, risulterebbe un aumento dei livelli di espressione dell'mRNA codificante per la molecola nei tessuti muscolare ed encefalico degli animali infetti, tanto di specie ovina che suina.

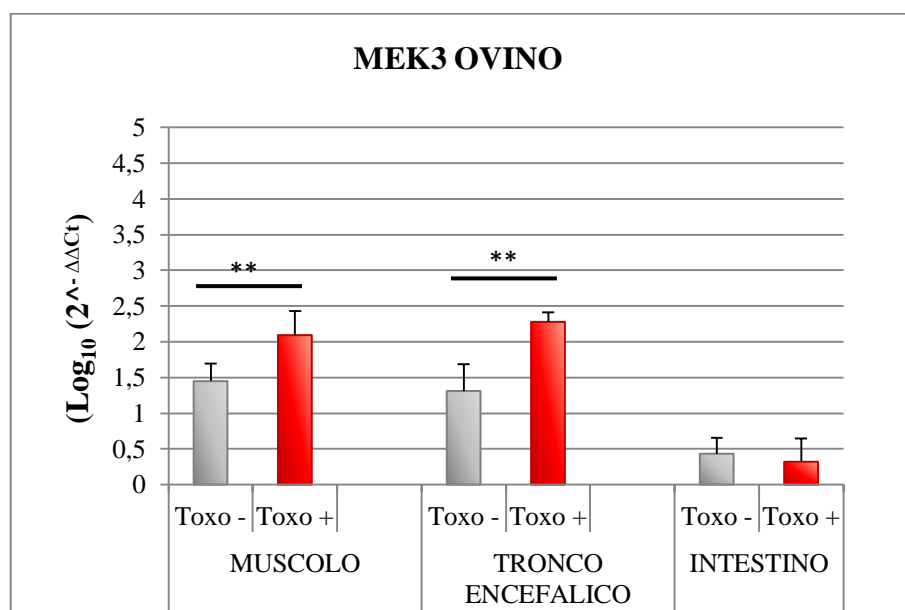


Figura 4.9: Variazione dei livelli di espressione di MEK3 tra ovini sani ed infetti. Calibratore interno: MEK3 Intestino ovini infetti.

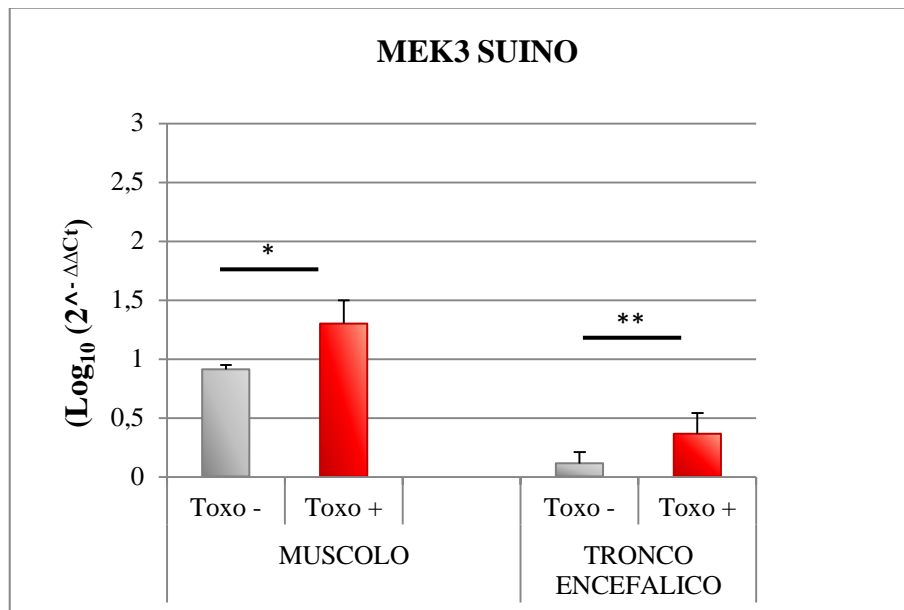


Figura 4.10: Variazione dei livelli di espressione di MEK3 tra suini sani ed infetti. Calibratore interno: MEK3 Tronco encefalico suini sani.

4.2.4 NOD2

Nod2 è un recettore cellulare capace di riconoscere proteine del parassita e mediare le risposte di immunità innata da parte dell'ospite, svolge dunque un ruolo fondamentale nel controllo della replicazione del parassita. Di seguito vengono riportati i grafici relativi ai profili di espressione del recettore. Le analisi effettuate hanno rilevato un aumento dei livelli di mRNA codificante per Nod2 nel tronco encefalico tanto degli ovini quanto dei suini infetti (figure 4.11 e 4.12).

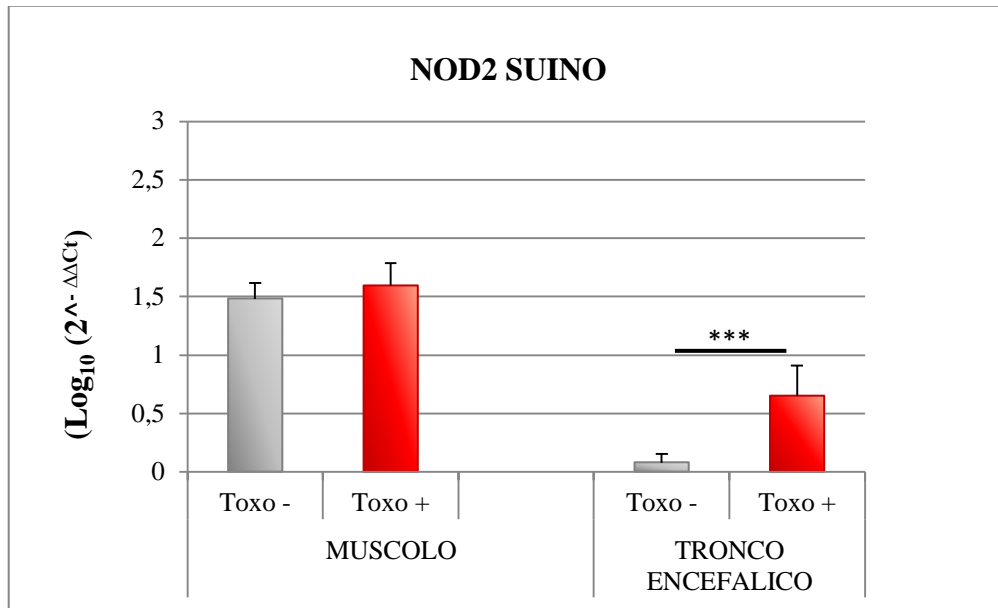


Figura 4.11: Variazione dei livelli di espressione di NOD2 tra suini sani ed infetti. Calibratore interno: Tronco encefalico suini sani.

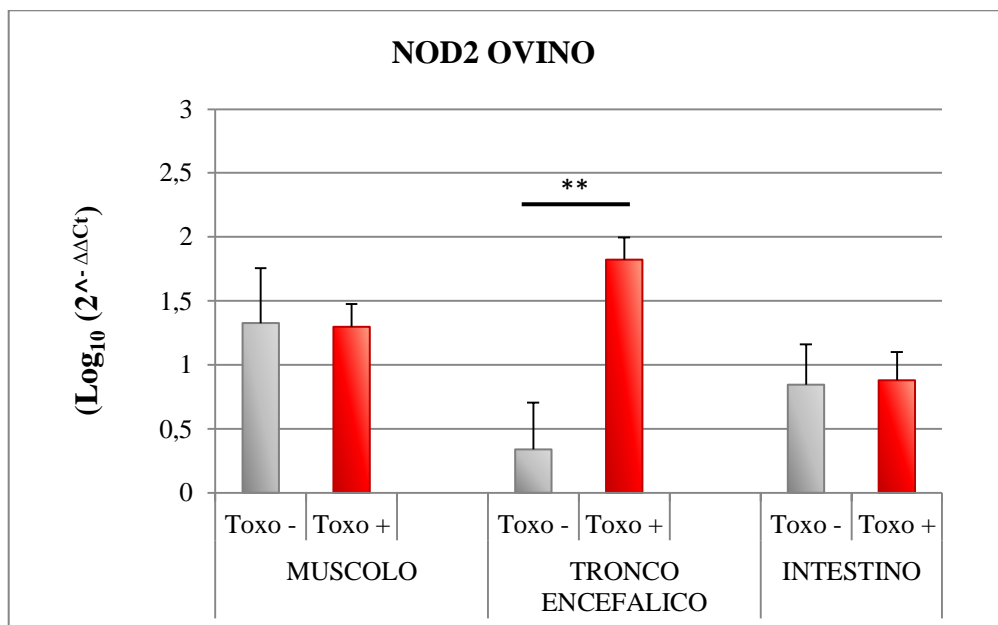


Figura 4.12: Variazione dei livelli di espressione di NOD2 tra ovini sani ed infetti. Calibratore interno: Tronco encefalico ovini sani.

L'analisi comparata di tale parametro tra animali sani delle specie oggetto di studio ha evidenziato livelli fisiologici di mRNA codificante per Nod2 nel tronco encefalico degli equini più elevati rispetto a ovini e suini, mentre a livello intestinale gli equini presentano livelli inferiori rispetto ai bovini.

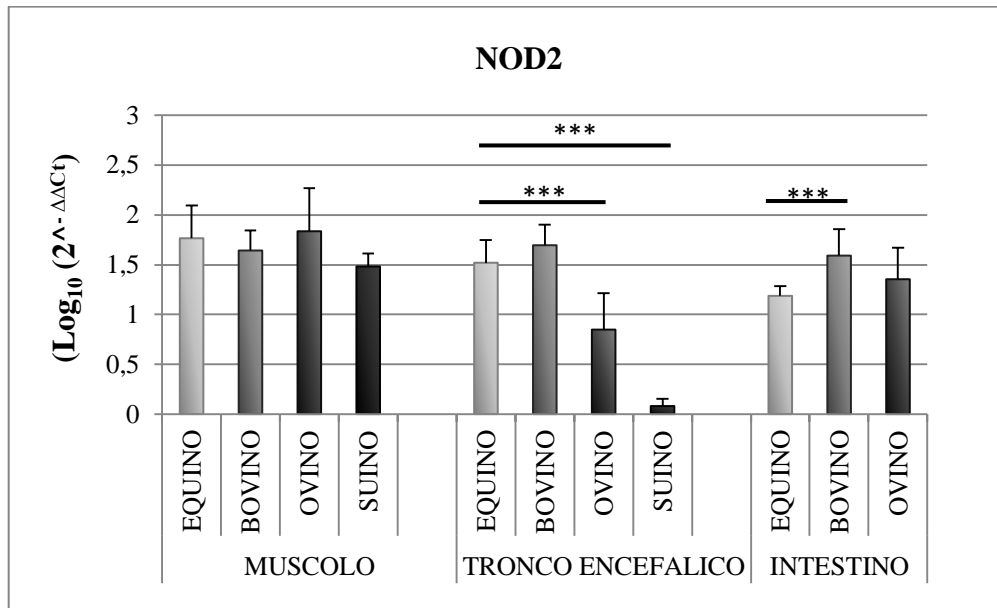


Figura 4.13: Analisi comparata dei livelli fisiologici di espressione di NOD2. Calibratore interno: Tronco encefalico suini.

CONCLUSIONI

La Toxoplasmosi è una zoonosi parassitaria particolarmente diffusa tanto tra gli animali selvatici quanto tra le specie domestiche. Sebbene la rilevanza di tale parassitosi, non solo in ambito veterinario ma anche per l'Uomo, sia chiara dagli anni '40 [Schwartzman J. *et al.*, 1945] e nonostante essa risulti tra le zoonosi di origine alimentare più diffuse in Europa [Report EFSA, 2016], l'entità del problema che rappresenta per la salute pubblica è ancora sottovalutata.

La ragione di tale poca considerazione del fenomeno è dovuta principalmente all'assenza di sintomi riscontrata nella maggior parte degli ospiti immunocompetenti che contraggono l'infezione. Nel caso in cui la stessa determini sintomi evidenti, questi possono essere particolarmente variabili sia in termini di tipologia che di severità. Nella maggior parte degli ospiti giovani o immunodepressi l'infezione causa sintomi enterici quali diarrea, disidratazione, dimagrimento e debilitazione. In alcuni casi, anche in soggetti adulti, possono manifestarsi sintomi più gravi come la corioretinite, ma i più frequenti vengono rilevati principalmente a carico del feto o allo stato neonatale. Tuttavia recentemente diversi studi hanno permesso di evidenziare una correlazione tra una condizione cronica ed asintomatica dell'infezione ed un maggiore rischio di insorgenza di patologie degenerative del sistema nervoso, nonché di fenomeni come la tendenza al suicidio e la depressione. Tra gli animali domestici le infezioni sono più comuni nei felini, negli ovi-caprini e nei suini. Per quanto concerne i bovini, invece, vengono riportati dati discordanti. Infatti in alcuni allevamenti si riscontrano incidenze relativamente elevate di soggetti sieropositivi, mentre in altri vengono individuati pochi capi infetti che presentano titoli anticorpali bassi e transitori, con rari isolamenti delle cisti a livello muscolare. Data la variabilità dei sintomi osservati tra le specie ospiti, lo scopo del presente studio è stato quello di valutare in animali positivi e negativi alla Toxoplasmosi alcuni parametri ematologici ed ematochimici generali, nonché *markers* ormonali e molecolari ipoteticamente correlati alle risposte a tale parassitosi. Inoltre è stato effettuato un confronto tra le specie da allevamento più

comuni, al fine di identificare delle discrepanze interessanti tra una specie tendenzialmente meno suscettibile come quella equina e specie più suscettibili quali bovini, ovini e suini. Dall'analisi dei parametri ematochimici valutati è stata evidenziata una differenza significativa delle componenti cellulari della linea bianca, notoriamente deputate alle risposte immunitarie. In particolare gli animali positivi alla Toxoplasmosi presentavano, rispetto al gruppo controllo, livelli più elevati di monociti nella specie ovina, di neutrofili nella specie bovina e di monociti e basofili nella specie equina. Tanto negli equini quanto negli ovini è stato osservato un aumento significativo delle proteine totali in animali positivi alla Toxoplasmosi rispetto al gruppo controllo, mentre solo negli ovini è stata rilevata una diminuzione significativa dei livelli di glucosio ematico in animali positivi all'infezione, parametro che rimaneva invariato negli equini. L'ultimo dato citato risulterebbe di particolare interesse, dal momento che, secondo quanto riportato in bibliografia, il glucosio dell'ospite sarebbe utile alla crescita e moltiplicazione di *T. gondii*, sebbene non indispensabile [Blume M. *et al.*, 2009]. Infatti in sua assenza il parassita riesce comunque a moltiplicarsi, utilizzando altri metaboliti come fonti energetiche. Sulla base di tale osservazione sarebbe plausibile ipotizzare che questa impossibilità del parassita stesso di consumare il glucosio dell'ospite possa costituire una condizione "non ottimale", in qualche modo collegabile alla minore incidenza di equini infetti riscontrata. Ovviamente il parassita avrebbe la capacità di utilizzare altri substrati e moltiplicarsi comunque, tuttavia l'invasione dell'ospite e la moltiplicazione del parassita potrebbero risultare meno favorite.

Per quanto riguarda la valutazione dei livelli di 5-HT circolante, sono state osservate condizioni opposte, con livelli di ormone significativamente più elevati negli ovini positivi rispetto al gruppo controllo e livelli più bassi negli equini positivi rispetto al gruppo controllo. Secondo quanto descritto in precedenza la serotonina svolge diverse funzioni immunomodulatorie, talvolta pro-infiammatorie, talvolta anti-infiammatorie. Sono ancora poco chiari i meccanismi alla base dell'una o dell'altra funzione, sebbene sia noto che il verificarsi della prima condizione o della seconda dipenda anche dal tipo di recettori attivati o inibiti dal neurotrasmettitore e da quanto i livelli di serotonina si discostino in

eccesso o in difetto rispetto alle concentrazioni fisiologiche. Per queste ragioni sarebbe interessante approfondire quali siano i *patterns* molecolari modulati nelle cellule preposte alle risposte immunitarie quando i livelli di serotonina sono significativamente più elevati rispetto a quelli fisiologici, come negli ovini, e quali vengano invece regolati nel caso in cui i livelli di neurotrasmettitore diminuiscono rispetto alle concentrazioni fisiologiche, come negli equini.

L'analisi dei profili di espressione ha interessato diverse molecole: Nod2 fa parte dei recettori coinvolti nelle risposte immunitarie innate, MEK3 rientra tra le MAP chinasi ed interviene in meccanismi di risposta ad ormoni, citochine e stress; PTEN, PI3K ed AKT1 regolano i meccanismi cellulari di proliferazione, apoptosi ed angiogenesi, con funzione inibitoria della prima rispetto alle seconde. Altre due molecole incluse nelle analisi sono HIF1 α ed il modulatore negativo PHD2. Secondo studi effettuati su cellule in coltura HIF1 α , che normalmente è attivo in condizioni di ipossia, verrebbe stabilizzato da *T. gondii* anche in presenza di ossigeno, mediante diversi meccanismi, inclusa la modulazione dei livelli di espressione di PHD2 [Wiley M. *et al.*, 2010]. Comparando i livelli di espressione di PHD2 tra animali positivi all'infezione e gruppo controllo, tale osservazione è stata confermata nel tessuto intestinale degli ovini, mentre non è stata rilevata variazione significativa a livello nervoso e muscolare. Secondo quanto riscontrato in bibliografia, in condizioni di normossia HIF1 α è espresso in maniera costitutiva, motivo per cui sono stati valutati i livelli basali del suo mRNA tra specie equina, bovina, ovina e suina, per verificare se già a livello fisiologico vi sia una differenza tra la prima e le seconde. È stato osservato che gli equini presentano livelli di espressione di HIF1 α più elevati rispetto alle altre specie a livello muscolare ed encefalico, mentre presentano livelli di espressione più bassi o comparabili a livello intestinale. Mettendo a confronto HIF1 α ed il suo inibitore, è stato osservato che in tutti i tessuti di ovini, bovini e suini analizzati PHD2 presenta livelli di espressione più elevati rispetto a HIF1 α , mentre negli equini a livello encefalico le due molecole presentano livelli di espressione comparabili. I dati appena descritti sarebbero in contrasto con l'ipotesi formulata all'inizio, secondo la quale gli equini avrebbero dovuto presentare livelli basali più bassi di

HIF1 α rispetto alle specie maggiormente suscettibili. Nel caso in cui tale dato venisse confermato anche dalla presenza di livelli di proteina più elevati negli equini rispetto a specie più suscettibili, sarebbe interessante valutare come ciò influisca sui *patterns* molecolari a valle di HIF1 α .

L'mRNA codificante per il recettore Nod2 presenta livelli di espressione più elevati in animali positivi alla toxoplasmosi rispetto al gruppo controllo, tanto negli ovini quanto nei suini, solo a livello del tronco encefalico. Nel tessuto citato, in condizioni fisiologiche, gli equini presentano livelli significativamente più elevati dell'mRNA codificante per Nod2 rispetto ad ovini e suini. Questa molecola agisce a monte del *pathway* di attivazione delle risposte immunitarie innate. Pertanto sarebbe plausibile ipotizzare che la maggiore quantità di recettore presente a livello basale negli equini comporti una attivazione più efficace della risposta infiammatoria nelle prime fasi di contatto con il tessuto encefalico, permettendo una più rapida distruzione dei parassiti. Diversamente nelle altre specie potrebbe verificarsi un ritardo iniziale nella sua attivazione ed una risposta più esacerbata successivamente, quando il parassita ha già avuto la possibilità di incistarsi. L'interesse per la valutazione dei livelli d'espressione di MEK3 era legato principalmente all'osservazione di una sua inibizione in cellule nervose umane in fase acuta di infezione da *T. gondii* in vitro [Xiao J. *et al.*, 2014]. Questo risultato ha suggerito di verificare che la stessa osservazione potesse essere fatta in animali di altre specie, naturalmente infettati, e non esclusivamente o necessariamente in fase acuta. Dai risultati ottenuti risulterebbe un aumento dei livelli di espressione dell'mRNA codificante per la molecola nei tessuti muscolare ed encefalico degli animali infetti, tanto di specie ovina che suina. Dal momento che in entrambi i gruppi l'infezione è stata diagnosticata rilevando la presenza di IgG e, in alcuni suini, anche la presenza di cisti tissutali, è ipotizzabile che in fase avanzata o cronica dell'infezione i livelli di espressione di questa molecola risultino incrementati e non ridotti.

Buona parte dei parametri analizzati presentano una variazione significativa tra gli equini e le specie ad essi comparate. Tuttavia, per poter affermare con maggiore sicurezza le considerazioni esposte, sarebbe necessario riuscire a

valutare i livelli di 5-HT in un maggior numero di equini infetti, eventualità piuttosto complicata data la scarsa incidenza di casi di sieropositività caratteristica di questa specie. In riferimento alle analisi dei profili di espressione, invece, le osservazioni effettuate su alcune delle molecole prese in esame potrebbero avere risvolti interessanti non soltanto in riferimento all'infezione da *T. gondii*, ma anche in ambiti applicativi differenti. Per questo motivo sarebbe molto utile comprendere come le variazioni dei livelli di mRNA osservate si rapportino con i livelli di proteine codificate.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Arias I., Sorlozano A., Villegas E., de Dios L.J., McKenney K., Cervilla J., Gutierrez B., Gutierrez J. **Infectious agents associated with schizophrenia: a meta-analysis.** (2012) *Schizophr Res* 136(1-3):128-36.
- [2] Askenase P.W., Herzog W.R., Millet I., Paliwal V., Ramabhadran R., Rochester C., Geba G.P., Ptak W. **Serotonin initiation of delayed-type hypersensitivity: mediation by a primitive Thy-1+ antigen-specific clone or by specific monoclonal IgE antibody.** (1991) *Skin Pharmacol* 4 (Suppl 1):25-42.
- [3] Barragan A., Sibley L.D. **Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence.** (2002) *J Exp Med* 195(12):1625-1633.
- [4] Blume M., Rodriguez-Contreras D., Landfear S., Fleige T., Soldati-Favre D., Lucius R., Gupta N. **Host-derived glucose and its transporter in the obligate intracellular pathogen *Toxoplasma gondii* are dispensable by glutaminolysis.** (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106(31):12998-3003.
- [5] Brown A.S. **Exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia.** (2011) *Front Psychiatry* 2:63.
- [6] Brown A.S., Schaefer C.A., Quesenberry C.P. Jr, Liu L., Babulas V.P., Susser E.S. **Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring.** (2005) *Am J Psychiatry* 162(4): 767-73.
- [7] Chen J., Li Z.Y., Zhou D.H., Liu G.H., Zhu X.Q. **Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* strains from different hosts and geographical regions revealed by sequence analysis of GRA5 gene.** (2012) *Parasites & Vectors* 5:279.
- [8] Cíz M., Komrsková D., Pracharová L., Okénková K., Cízová H., Moravcová A., Jancinová V., Petříková M., Lojek A., Nosál R. **Serotonin modulates the oxidative burst of human phagocytes via various mechanisms.** (2007) *Platelets* 18 (8):583-90.

- [9] Cloez-Tayarani I., Petit-Bertron A.F., Venters H.D., Cavaillon J.M. **Differential effect of serotonin on cytokine production in lipopolysaccharide- stimulated human peripheral blood mononuclear cells: involvement of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors.** (2003) *Int Immunol* 15(2):233-40.
- [10] Davis W.J., Lehmann P.Z., Li W. **Nuclear PI3K signaling in cell growth and tumorigenesis.** (2015) *Front Cell Dev Biol* 3:24.
- [11] Denkers E.Y. & Gazzinelli R.T. **Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection.** (1998) *Clin Microbiol Rev* 11(4): 569-88.
- [12] Dubey J.P., Gamble H.R., Hill D., Sreekumar C., Romand S., Thuilliez P. **High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts.** (2002) *J Parasitol* 88(6):1234-8.
- [13] Dubey J.P., Jones J.L. ***Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States.** (2008) *Int J Parasitol* 38(11):1257-78.
- [14] Duerschmied D., Bode C., Ahrens I. **Immune functions of platelets.** (2014) *Thromb Haemost* 112(4):678-91.
- [15] Duerschmied D., Suidan G.L., Demers M., Herr N., Carbo C., Brill A., Cifuni S.M., Mauler M., Cicko S., Bader M., Idzko M., Bode C., Wagner D.D. **Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice.** (2013) *Blood* 121(6):1008-15.
- [16] Dunay I.R., Sibley L.D. **Monocytes mediate mucosal Immunity to *Toxoplasma gondii*.** (2010) *Curr Opin Immunol* (2010) 22(4):461-6.
- [17] Dürk T., Panther E., Müller T., Sorichter S., Ferrari D., Pizzirani C., Di Virgilio F., Myrtek D., Norgauer J., Idzko M. **5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes.** (2005) *Int Immunol* 17(5):599-606.
- [18] Evans D.L., Lynch K.G., Benton T., Dubé B., Gettes D.R., Tustin N.B., Lai J.P., Metzger D., Douglas S.D. **Selective serotonin reuptake inhibitor and substance P antagonist enhancement of natural killer cell innate**

- immunity in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. (2008) *Biol Psychiatry* 63(9):899-905.
- [19] EFSA supporting publication, European Food Safety Authority 2016:EN-995.
- [20] Ferguson D.J. **Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host.** (2004) *Int J Parasitol* 34(3):347-360.
- [21] Fiebich B.L., Akundi R.S., Lieb K., Candelario-Jalil E., Gmeiner D., Haus U., Müller W., Stratz T., Muñoz E. **Antiinflammatory effects of 5-HT₃ receptor antagonists in lipopolysaccharide-stimulated primary human monocytes.** (2004) *Scand J Rheumatol Suppl* 119:28-32.
- [22] Franke K., Gassmann M., Wielockx B. **Erythrocytosis: the HIF pathway in control.** (2013) *Blood* 122(7):1122-8.
- [23] Frenkel J.K., Dubey J.P., Miller N.L. ***Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts.** (1970) *Science* 167(3919):893-6.
- [24] Gatkowska J., Wieczorek M., Dziadek B., Dzitko K., Dlugonska H. **Sex-dependent neurotransmitter level changes in brains of *Toxoplasma gondii* infected mice.** (2013) *Exp Parasitol* 133(1):1-7.
- [25] Goodwin D., Hrubec T.C., Klein B.G., Strobl J.S., Werre S.R., Han Q., Zajac A.M., Lindsay D.S. **Congenital infection of mice with *Toxoplasma gondii* induces minimal change in behavior and no change in neurotransmitter concentrations.** (2012) *J Parasitol* 98(4):706-12.
- [26] Groër M.W., Yolken R.H., Xiao J.C., Beckstead J.W., Fuchs D., Mohapatra S.S., Seyfang A., Postolache T.T. **Prenatal depression and anxiety in *Toxoplasma gondii* positive women.** (2011) *Am J Obstet Gynecol* 204(5):433.e1-7.
- [27] Halonen S.K. & Weiss L.M. **Toxoplasmosis.** (2013) *Handb Clin Neurol* 114:125-45.
- [28] Hellstrand K., Czerkinsky C., Ricksten A., Jansson B., Asea A., Kylefjord H., Hermodsson S. **Role of serotonin in the regulation of interferon-gamma production by human natural killer cells.** (1993) *J Interferon Res* 13(1):33-8.

- [29] Hellstrand K., Hermodsson S. **Enhancement of human natural killer cell cytotoxicity by serotonin: role of non-T/CD16+ NK cells, accessory monocytes, and 5-HT1A receptors.** (1990) *Cell Immunol* 127(1):199-214.
- [30] Hellstrand K., Hermodsson S. **Serotonergic 5-HT1A receptors regulate a cell contact-mediated interaction between natural killer cells and monocytes.** (1993) *Scand J Immunol* 37(1):7-18.
- [31] Hernandez M.E., Martinez-Fong D., Perez-Tapia M., Estrada-Garcia I., Estrada-Parra S., Pavón L. **Evaluation of the effect of selective serotonin-reuptake inhibitors on lymphocyte subsets in patients with a major depressive disorder.** (2010) *Eur Neuropsychopharmacol* 20(2):88-95.
- [32] Herr N., Bode C., Duerschmied D. **The effects of Serotonin in Immune Cells.** (2017) *Front Cardiovasc Med* 20;4:48.
- [33] Herr N., Mauler M., Witsch T., Stallmann D., Schmitt S., Mezger J., Bode C., Duerschmied D. **Acute fluoxetine treatment induces slow rolling of leukocytes on endothelium in mice.** (2014) *PLoS One* 9(2):e88316.
- [34] Hsu P.C., Groer M., Beckie T. **New findings: depression, suicide, and *Toxoplasma gondii* infection.** (2014) *J Am Assoc Nurse Pract* 26(11):629-37.
- [35] Ihara F., Nishimura M., Muroi Y., Mahmoud M.E., Yokoyama N., Nagamune K., Nishikawa Y. ***Toxoplasma gondii* infection in Mice impairs Long-Term Fear Memory Consolidation Through dysfunction of the Cortex and Amygdala.** (2016) *Infect Immun* 19; 84(10):2861-70.
- [36] Iken K., Chheng S., Fargin A., Goulet A.C., Kouassi E. **Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT1A receptors.** (1995) *Cell Immunol* 163(1):1-9.
- [37] Ito T., Ikeda U., Shimpo M., Yamamoto K., Shimada K. **Serotonin increases interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells.** (2000) *Circulation* 102(20):2522-7.
- [38] Jancinová V., Nosál R., Drábiková K., Danihelová E. **Cooperation of chloroquine and blood platelets in inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence.** (2001) *Biochem. Pharmacol.* 62(12):1629-36.

- [39] Jenkins T.A., Nguyen J.C.D, Polglaze K.E., Bertrand P.P. **Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis.** (2016) *Nutrients* 8(1).
- [40] Kubera M., Maes M., Kenis G., Kim Y.K., Lason W. **Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6.** (2005) *Psychiatry Res* 134(3):251-8.
- [41] Kusbeci O.Y., Miman O., Yaman M., Aktepe O.C., Yazar S. **Could *Toxoplasma gondii* have any role in Alzheimer disease?** (2011) *Alzheimer Dis Assoc Disord* 25(1):1-3.
- [42] Kwok L.Y., Lütjen S., Soltek S., Soldati D., Busch D., Deckert M., Schlüter D. **The induction and kinetics of antigen-specific CD8 T cells are defined by the stage specificity and compartmentalization of the antigen in murine toxoplasmosis.** (2003) *J Immunol* 170 (4):1949-57.
- [43] Léon-Ponte M., Ahern G.P., O’Connell P.J. **Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor.** (2007) *Blood* 109(8):3139-46.
- [44] Lindsay D.S., Dubey J.P. **Toxoplasmosis in wild and domestic animals.** p 133–152. *In* Kim K., Weiss L.M. *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan.* (2004). *Int J Parasitol.* 34(3):423-32.
- [45] Livak K.J., Schmittgen T.D., **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** (2001) *Methods* 25(4):402-8.
- [46] Mai K., Sharman P.A., Walker R.A., Katrib M., De Souza D., McConville M.J., Wallach M.G., Belli S.I., Ferguson D.J., Smith N.C. **Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites.** (2009) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(2):281-9.
- [47] Marino A.M.F., Percipalle M., Giunta R.P., Salvaggio A., Caracappa G., Alfonzetti T., Aparo A., Reale S. **Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA in animal and meat samples.** (2017) *J Vet Diagn Invest* 29(2):203-207.

- [48] McConkey G.A., Martin H.L., Bristow G.C., Webster J.P. ***Toxoplasma gondii* infection and behavior- location, location, location?** (2013) J Exp Biol 216(Pt 1):113-9.
- [49] Miman O., Mutlu E.A., Ozcan O., Atambay M., Karlidag R., Unal S. **Is there any role of *Toxoplasma gondii* in the etiology of obsessive-compulsive disorder?** (2010a) Psychiatry Res 177(1-2):263-5.
- [50] Miman O., Kusbeci O.Y., Aktepe O.C., Cetinkaya Z. **The probable relation between *Toxoplasma gondii* and Parkinson's Disease.** (2010b) Neurosci Lett 475(3):129-31.
- [51] Minamishima Y.A., Moslehi J., Bardeesy N., Cullen D., Bronson R.T., Kaelin W.G. Jr. **Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure** (2008) Blood 111(6), 3236-44.
- [52] Montoya J.G., Liesenfeld O. **Toxoplasmosis.** (2004) Lancet 363(9425):1965-76.
- [53] Müller T., Dürk T., Blumenthal B., Grimm M., Cicko S., Panther E., Sorichter S., Herouy Y., Di Virgilio F., Ferrari D., Norgauer J., Idzko M. **5-hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo.** (2009) PLoS One 4(7):e6453.
- [54] Nau F. Jr, Yu B., Martin D., Nichols C.D. **Serotonin 5-HT_{2A} receptor activation blocks TNF- α mediated inflammation in vivo.** (2013) PLoS One 8(10):e75426.
- [55] Nicolle C., Manceaux L.H. **On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. 1908.** In Ajioka J.W., Morrissette N.S. **A century of *Toxoplasma* research.** (2009) Int J Parasitol 39(8):863-4.
- [56] Nordlind K., Sundström E., Bondesson L. **Inhibiting effects of serotonin antagonists on the proliferation of mercuric chloride stimulated human peripheral blood T lymphocytes.** (1992) Int Arch Allergy Immunol 97(2):105-8.
- [57] Opsteegh M., Teunis P., Züchner L., Koets A., Langelaar M., van der Giessen J. **Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii***

- in cattle for detection of parasite DNA.** (2011) *Int J Parasitol* 41(3-4):343-54.
- [58] Pearce B.D., Kruszon-Moran D., Jones J.L. **The relationship between *Toxoplasma gondii* infection and mood disorders in the third National Health and Nutrition Survey.** (2012) *Biol Psychiatry* 72(4):290-5.
- [59] Pomares C., Ajzenberg D., Bornard L., Bernardin G., Hasseine L., Darde M.L., Marty P. **Toxoplasmosis and horse meat, France.** (2011) *Emerg Infect Dis* 17(7):1327-8.
- [60] Robert-Gangneux F., Dardé M.L. **Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis.** (2012) *Clin Microbiol Rev* 25(2):264-96.
- [61] Roos D.S., Crawford M.J., Donald R.G., Kissinger J.C., Klimczak L.J., Striepen B. **Origin, targeting and function of the apicomplexan plastid.** (1999) *Curr Opin Microbiol* 2(4):426-32.
- [62] Schwartzman J., Maffia A. *et al.* **Congenital toxoplasmosis.** (1948) *J Pediatr* 33(1):66-73.
- [63] Shaw M.H., Reimer T., Sánchez-Valdepeñas C., Warner N., Kim YG., Fresno M., Nuñez G. **T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*.** (2009) *Nat Immunol* 10(12):1267-74.
- [64] Sternberg E.M., Trial J., Parker C.W. **Effect of serotonin on murine macrophages: suppression of Ia expression by serotonin and its reversal by 5-HT₂ serotonergic receptor antagonists.** (1986) *J Immunol* 137(1):276-82.
- [65] Sternberg E.M., Wedner H.J., Leung M.K., Parker C.W. **Effect of serotonin (5-HT) and other monoamines on murine macrophages: modulation of interferon-gamma induced phagocytosis.** (1987) *J Immunol* 138(12):4360-5.
- [66] Stibbs H.H. **Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in *Toxoplasma gondii* infected mice.** (1985) *Ann Trop Med Parasitol* 79:153-7.
- [67] Takeda K., Aguila H.L., Parikh N.S., Li X., Lamothe K., Duan L. J., Takeda H., Lee F. S., Fong G. H. **Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins.** (2008) *Blood* 111(6): 3229-35.

- [68] Takeda K., Cowan A., Fong G.H. **Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system.** (2007) *Circulation* 116(7):774-781.
- [69] Thomas F., Lafferty K.D., Brodeur J., Elguero E., Gauthier-Clerc M., Missé D. **Incidence of adult brain cancers is higher in countries where the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* is common.** (2012) *Biol Lett* 8(1): 101-3.
- [70] Toker A. & Marmiroli S. **Signaling Specificity in the Akt Pathway in Biology and Disease.** (2014) *Adv Biol Regul* 55:28-38.
- [71] Tsuchida Y., Hatao F., Fujisawa M., Murata T., Kaminishi M., Seto Y., Hori M., Ozaki H. **Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via $\alpha 7$ nACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus.** (2011) *Gut* 60(5):638-47.
- [72] Vanhaesebroeck B., Guillermet-Guibert J., Graupera M., Bilanges B. **The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling.** (2010) *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(5):329-341.
- [73] Vittecoq M., Elguero E, Lafferty KD, Roche B, Brodeur J, Gauthier-Clerc M, Missé D, Thomas F. **Brain cancer mortality rates increase with *Toxoplasma gondii* seroprevalence in France.** (2012) *Infect Genet Evol* 12(2): 496-8.
- [74] Yohn C.N., Gergues M.M., Samuels B.A. **The role of 5-HT receptors in depression.** (2017) *Molecular Brain* 10(1):28.
- [75] Walther A., Petri E., Peter C., Czabanka M., Martin E. **Selective serotonin-receptor antagonism and microcirculatory alterations during experimental endotoxemia.** (2007) *J Surg Res* 143(2):216-23.
- [76] Wang Z.T., Harmon S., O'Malley K.L., Sibley L.D. **Reassessment of the role of aromatic amino acid hydroxylases and the effect of infection by *Toxoplasma gondii* on host dopamine.** (2015) *Infect Immun* 83(3):1039-47.
- [77] Werth N., Beerlage C., Rosenberger C., Yazdi A.S., Edelmann M., Amr A., Bernhardt W., von Eiff C., Becker K., Schäfer A., Peschel A., Kempf V.A.

- Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens.** (2010) PLoS One 5(7): e11576.
- [78] Wiley M., Sweeney K.R., Chan D.A., Brown K.M., McMurtrey C., Howard E.W., Giaccia A.J., Blader I.J. ***Toxoplasma gondii* activates Hypoxia-inducible Factor (HIF) by Stabilizing the HIF-1alpha subunit via Type I activin-like receptor kinase receptor signaling.** (2010) J Biol Chem 285(35): 26852-60.
- [79] Xiao J., Li Y., Prandovszky E., Karuppagounder S.S., Talbot C.C. Jr, Dawson V.L., Dawson T.M., Yolken R.H. **MicroRNA-132 dysregulation in *Toxoplasma gondii* infection has implications for dopamine signaling pathway.** (2014) Neuroscience 268:128-38.
- [80] Yang S.H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. **MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation.** (2013) Gene 513(1):1-13.
- [81] Yazar S., Arman F, Yalçın S, Demirtaş F, Yaman O, Sahin I. **Investigation of probable relationship between *Toxoplasma gondii* and cryptogenic epilepsy.** (2003) Seiz Eur J Epil 12(2):107-9.
- [82] Yu B., Becnel J., Zerfaoui M., Rohatgi R., Boulares A.H., Nichols C.D. **Serotonin 5-hydroxytryptamine(2A) receptor activation suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced inflammation with extraordinary potency.** (2008) J Pharmacol Exp Ther 327(2):316-23.
- [83] Yu H., Littlewood T., Bennett M. **Akt isoforms in vascular disease.** (2015) Vascul Pharmacol 71:57-64.