



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE
Dottorato di Ricerca in “Scienze Veterinarie”
Coordinatore: Prof. ssa Rosaria Laurà
Curriculum:
Scienze Cliniche Veterinarie
S.S.D. VET/08

**Studio clinico sull'utilizzo di un agonista del
GnRH (deslorelina acetato)
in cani affetti da leishmaniosi.**

Tesi di Dottorato:
Dott. Vito Biondi

Tutor:
Chiar.^{ma} Prof. ssa Annamaria Passantino

Triennio 2018/2020

1. LEISHMANIOSI

1.1 Introduzione

La leishmaniosi è una malattia parassitaria causata da protozoi del genere *Leishmania spp.* e trasmessa da insetti vettori, appartenenti ai generi *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, ad ospiti mammiferi.

Nell'uomo la malattia si manifesta in tre forme principali: cutanea (CL), mucocutanea (ML) e viscerale (VL) (Alvar *et al.*, 2012) e risulta essere causata da sei specie di *Leishmania*: *L. tropica*, *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*.

Il parassita fu osservato per la prima volta in India, nel 1885, da Cunningham in persone affette dal cosiddetto “Bottone d'Oriente” e nel 1903 dei microrganismi identici, isolati da soggetti ammalati di “Kala-azar”, furono descritti da Leishman e Donovan.

Nel cane fu segnalata per la prima volta nel 1908 da Nicolle e Comte (Nicolle & Comte, 1908) che individuarono nel cane il ruolo di serbatoio.

L'agente eziologico principale della Leishmaniosi canina (LCan) è *L. infantum*. LCan è una delle malattie emergenti più importanti del mondo (WHO, 2010).

Tra le specie domestiche il cane sembra ad oggi rappresentare l'unico serbatoio di rilevanza epidemiologica (Maroli *et al.*, 2002). L'infezione è più comune in canidi (De Almeida Curi *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008; Roque & Jansen, 2014; Saliba & Oumeish, 1999; Souza *et al.*, 2010) e roditori (Caldart *et al.*, 2017; Tsakmakidis & Dovas, 2017), ma un'ampia varietà di specie

animali domestiche e selvatiche possono essere infettate, anche se raramente manifestano la malattia. In letteratura, infatti, sono stati descritti casi di malattia in felidi (Dahroug *et al.*, 2010, 2011; Maroli *et al.*, 2007;), lagomorfi (García *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2012; Tsokana *et al.*, 2016), perissodattili (Aguilar *et al.*, 1989; Soares *et al.*, 2013), procionidi (Lainson *et al.*, 1989, 2010) e primati (Lainson *et al.*, 1989; Malta *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda il gatto domestico (*Felis catus*) è stato dimostrato che è suscettibile all'infezione da *L. infantum*; i soggetti colpiti, tuttavia, sembrano avere una certa resistenza, a meno che essi non abbiano in concomitanza patologie che compromettano il loro sistema immunitario, quali infezioni sostenute da *Feline Immunodeficiency Virus* (FIV) e *Feline Leukemia Virus* (FeLV) (Solano-Gallego *et al.*, 2007), o ancora malattie di origine autoimmune o neoplastiche. Ancora oggi è oggetto di studio il ruolo della specie felina nel mantenere il ciclo vitale del parassita e l'eventualità di fungere da serbatoio secondario (Maia & Campino, 2011; Pennisi & Persichetti, 2018).

1.2 Epidemiologia

La leishmaniosi è endemica in 88 paesi (72 dei quali in via di sviluppo) e circa 12 milioni di persone ne sono affette, con un'incidenza mondiale stimata intorno a 1-2 milioni di nuovi casi all'anno, di cui circa 600.000 affetti dalla forma viscerale (VL) ed i restanti dalla forma cutanea (CL) (WHO, 2010; Dujiardin *et al.*, 2008).

In Europa, le aree maggiormente colpite sono quelle del bacino del Mediterraneo dove la malattia assume carattere endemico ed è sostenuta quasi esclusivamente da *L. infantum*.

Per quanto riguarda la Leishmaniosi Canina in Europa, ad oggi si stimano circa 2.5/3 milioni di casi (www.salute.gov.it).

In Italia, dove la prima segnalazione risale al 1910, la patologia fino agli anni '80 era confinata nel centro-sud Italia e nelle isole maggiori (Pozio *et al.*, 1985). Oggi, invece, i focolai di Leishmaniosi canina sono presenti su tutto il territorio nazionale a seguito delle più frequenti

movimentazioni di cani senza una stretta sorveglianza, provenienti da aree endemiche (Maroli *et al.*, 2008; Petersen & Barr, 2009; Otranto *et al.*, 2009; Otranto & Dantas-Torres, 2013), nonché a seguito dei cambiamenti climatici. La percentuale media di sieroprevalenza nel cane per l'anno 2017 è stata del 18,65%, con un numero totale di 55.774 esami svolti, di cui 10.402 esami positivi (www.salute.gov.it).

Nel Nord Italia la percentuale media di siero prevalenza nel 2017 è del 14,21% con un numero totale di 24.716 esami svolti, di cui 3.513 esami positivi, ovvero con un valore cut-off di 1:40, nel Centro Italia la sieroprevalenza nel 2017 è del 7,42% con un numero totale di 14.181 esami svolti di cui 1.053 esami positivi, mentre nel Sud Italia la percentuale media di sieroprevalenza nel 2017 è del 32,76 % con un numero totale di 16.627 esami svolti, di cui 5.448 esami positivi, ovvero con un valore cut-off di 1:160 (www.salute.gov.it).

1.3 Eziologia

Classificazione *Leishmania spp.*

La *Leishmania* è un protozoo intracellulare obbligato del sistema reticolo-istiocitario dell'uomo e di altri mammiferi, quali canidi (De Almeida Curi *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008; Roque & Jansen, 2014; Saliba & Oumeish, 1999; Souza *et al.*, 2010) roditori (Caldart *et al.*, 2017; Tsakmakidis & Dovas, 2017), felidi (Dahroug *et al.*, 2010; Dahroug *et al.*, 2011; da Silva *et al.*, 2010; Maroli *et al.*, 2007;), lagomorfi (García *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2012; Tsokana *et al.*, 2016), perissodattili (Aguilar *et al.*, 1989; Soares *et al.*, 2013), procionidi (Lainson *et al.*, 1989, 2010) e primati (Lainson *et al.*, 1989; Malta *et al.*, 2010), trasmesso da un vettore biologico rappresentato dal flebotomo.

Al giorno d'oggi si conoscono circa trenta specie di *Leishmania* delle quali una ventina sono considerate patogene per l'uomo.

La classificazione elaborata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 1990 si basa sulla biologia del protozoo, sulla specie di flebotomo responsabile della trasmissione e soprattutto sul corredo enzimatico del parassita.

Il genere *Leishmania* spp. appartiene al Phylum: *Sarcomastigophora*, Subphylum: *Mastigophora*, Classe: *Zoomastigophora*, Ordine: *Kinetoplastida*, Sottordine: *Trypanosomatinae*, Famiglia: *Trypanosomatidae*, Genere: *Leishmania*.

In figura 1 viene riportata la tassonomia della *Leishmania*.

Il genere è a sua volta suddiviso, sulla base dello sviluppo nel flebotomo, in due sottogeneri: *Leishmania*, presente sia nel Vecchio che nel Nuovo Mondo, e *Viannia* limitato solo al Nuovo Mondo.

Le diverse specie di *Leishmania* sono quindi raggruppate in *complex* o complessi, a seconda della forma clinica di cui sono responsabili.

In Italia è presente una sola specie di *Leishmania* la *L. infantum*, appartenente al *complex donovani* (Fraga *et al.*, 2010), i cui ceppi viscerotropi sono responsabili della leishmaniosi canina e della leishmaniosi viscerale umana (VL), mentre i ceppi dermatotropi sono responsabili della leishmaniosi cutanea (CL) dell'uomo.

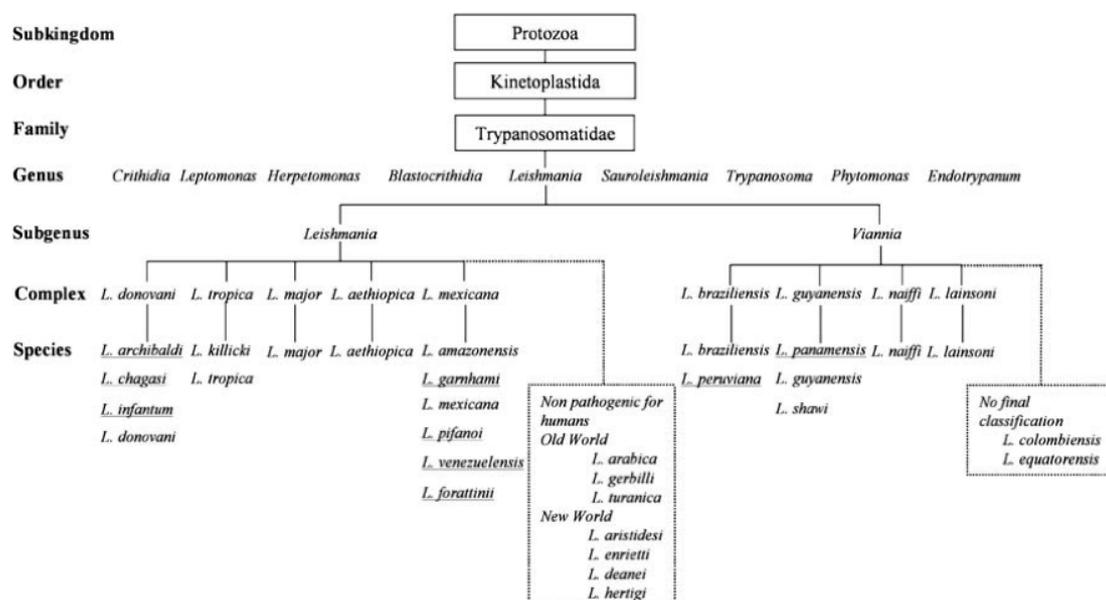


Figura 1 - Tassonomia di *Leishmania* (Bañuls *et al.*, 2007)

Vettore

I flebotomi sono ditteri ematofagi appartenenti alla Famiglia *Psychodidae*, sottofamiglia *Phlebotominae*, la quale comprende circa 700 specie aggregabili in cinque generi: *Phlebotomus*, *Sergentomya*, *Warileya*, *Lutzomya*, *Brumptomya*. Ai primi due generi appartengono le otto specie descritte in Italia: *P. perniciosus*, *P. pefiliewi*, *P. mayor*, *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. ariasi*, *P. mascittii* e *S. minuta*. Solo le femmine si nutrono di sangue, necessario per la maturazione delle loro uova. I maschi sono, invece, glicifagi.

Ciclo biologico di *Leishmania infantum*

La *Leishmania* è un protozoo dixeno, in quanto il suo ciclo biologico per completarsi necessita di due ospiti: un mammifero, che è l'ospite definitivo e può anche fungere da serbatoio, e un insetto rappresentato dal flebotomo, il quale svolge il ruolo di ospite intermedio e vettore biologico. Nel primo il parassita si trova a livello intracellulare sotto forma di amastigote, cioè priva di flagello, mentre nel secondo è nella forma di promastigote, cioè flagellata e mobile.

Il ciclo biologico della *L. infantum* comincia con il pasto di sangue del flebotomo su un cane infetto e l'ingestione della forma aflagellata del protozoo (amastigote); nel suo apparato digerente l'agente patogeno assume la forma flagellata infettiva (promastigote), che viene reinoculata nella cute dell'ospite vertebrato con il pasto successivo, ricominciando così il suo ciclo (Kaye Scott, 2011; Laskay *et al.*, 2003).

Dopo essere stati inoculati, i promastigoti raggiungono il torrente circolatorio e sono fagocitati dai macrofagi in cui si trasformano nuovamente nella forma aflagellata di amastigote, resistente alla distruzione da parte del fagolisosoma.

Il parassita, all'interno delle cellule fagocitarie, si moltiplica continuamente per via asessuata fino a causarne la rottura; a questo punto gli amastigoti liberati invadono altre cellule del

sistema reticolo-endoteliale e l'infezione si diffonde verso altri siti e soprattutto verso quelli più ricchi di queste cellule, quali milza, fegato, linfonodi e midollo osseo (Ayele & Seyoum, 2016; Bates, 2007; Dostalova & Volf, 2012; Gharbi *et al.*, 2015; Kaszak *et al.*, 2015).

1.4 Trasmissione di *Leishmania infantum*

Affinché si mantenga la sopravvivenza del parassita, questo deve avere un serbatoio in cui riprodursi e l'opportunità di diffondere ad altri ospiti suscettibili, attraverso la presenza nel territorio del vettore specifico.

In Italia, l'unico ciclo di trasmissione provato è quello zoonotico di *L. infantum* (Ready, 2008; Desjeux, 1991), in cui l'ospite definitivo e serbatoio è rappresentato dal cane, mentre l'uomo è considerato un ospite accidentale o occasionale, che si infetta per la puntura di flebotomi che hanno precedentemente punto cani infetti, ma non contribuisce alla trasmissione.

Nell'uomo, infatti, non esiste contagio interumano, né diretto (uomo-uomo) né indiretto (uomo-flebotomo-uomo).

Vie alternative di trasmissione

Molti studi hanno segnalato la trasmissione dell'infezione per via sessuale e transplacentare in molti ospiti quali il topo (Rosypal & Lindsay, 2005), l'uomo (Boehme *et al.*, 2006; Meinecke *et al.*, 1999; Pagliano *et al.*, 2005; Zinchuk & Nadraga, 2010) e il cane (Ben Slimane *et al.*, 2014; Naucke & Lorentz, 2012; Riera & Valladares, 1996; Rosypal *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2009). In particolare, nella specie canina la trasmissione per via venerea sembra essere più efficiente da un maschio infetto a una femmina sensibile (Turchetti *et al.*, 2014). Da uno studio condotto negli

USA sono state riscontrate positività alla PCR in cuccioli nati da cagne naturalmente infette, che all'anamnesi non avevano storia di spostamenti in zone endemiche. Questa è stata la prima segnalazione di trasmissione verticale di *L. infantum* in cani naturalmente infetti in America del Nord e ha sottolineato che queste modalità potrebbero sostenere l'infezione all'interno delle popolazioni canine, anche in assenza di vettori competenti (Boggiatto *et al.*, 2011; Masucci *et al.*, 2003).

Altre vie di trasmissione nell'uomo e nel cane sono rappresentate da trasfusione di sangue o emoderivati (Riera *et al.*, 2008; Tabar *et al.*, 2008; de Freitas *et al.*, 2006; Kyriakou *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2000; Cardo, 2006; Owens *et al.*, 2001; Giger *et al.*, 2002), trapianto di organi da donatori infetti (Antinori *et al.*, 2008) e condivisione di aghi contaminati (Chicharro *et al.*, 1999; Morillas-Marquez *et al.*, 2002), anche se al momento sono necessari ulteriori approfondimenti per stabilire un loro effettivo ruolo.

Altra via di trasmissione sospettata è quella diretta tra cani, attraverso morsi o ferite cutanee (Karkamo *et al.*, 2014; Naucke *et al.*, 2016).

Non si hanno ancora evidenze scientifiche, invece, circa il possibile ruolo di altri vettori, quali alcuni ectoparassiti ematofagi (pulci, zecche e zanzare), nella trasmissione della malattia (Baneth, 2014; Dantas-Torres, 2011; WHO, 2010).

1.5 Patogenesi e immunologia dell'infezione da *Leishmania infantum*

Il manifestarsi della malattia e l'entità dei segni clinici della leishmaniosi nel cane dipendono da molti fattori, che includono il ceppo parassitario, la genetica e lo stato immunitario e sanitario dell'ospite.

L'efficacia della risposta immunitaria, in particolare, è un aspetto fondamentale nella patogenesi della malattia e nella sua progressione (Alvar *et al.*, 2004). In alcuni cani in grado di controllare l'infezione è predominante una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediata ad opera dei linfociti T helper 1 (Th1) che, grazie alla produzione di alcune citochine (IL-2 e IFN- γ),

promuovono l'attivazione dei macrofagi (Hosein *et al.*, 2017; Koutinas & Koutinas, 2014). All'interno dei macrofagi, l'enzima iNOS (sintetasi inducibile dell'ossido nitrico) stimola la produzione di ossido nitrico, causando la morte del parassita e controllandone quindi la diffusione (Holzmuller *et al.*, 2005).

Nei soggetti clinicamente malati, invece, predomina un notevole incremento della risposta umorale e una riduzione di quella cellulare, che sarà di tipo misto Th1/Th2, con prevalenza di linfociti T helper 2. Questi ultimi riducono il rilascio di citochine "positive" da parte dei Th1 e sono responsabili della produzione di altre citochine, come IL-4 e IL-10 che, insieme alla intensa risposta anticorpale, sembrano essere correlate alla progressione della malattia (Hosein *et al.*, 2017; Koutinas & Koutinas, 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Diversi Autori (De Vasconcelos *et al.*, 2019; Quinnell *et al.*, 2003) hanno evidenziato che in alcune razze canine, in particolare nel Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e Pastore Tedesco, la suscettibilità alla malattia sembra essere associata all'espressione del gene SLC11A1 (*Solute Carrier Family 11 Member 1*) e/o al polimorfismo del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II, mentre il Podenco Ibenco sembra essere la razza più resistente all'infezione (De Vasconcelos *et al.*, 2019).

1.6 Sintomatologia

I segni clinici riscontrati con maggiore frequenza in cani naturalmente infetti da *L. infantum* sono: linfadenomegalia generalizzata, dimagrimento, alopecia generalizzata non pruriginosa, associata ad alterazioni dermatologiche multiple, incluse lesioni esfoliative ed ulcerative del tartufo e delle prominenze ossee degli arti posteriori, blefarite bilaterale ed onicogrifosi.

La linfadenomegalia è uno dei primi segni clinici a comparire e principalmente interessa i linfonodi poplitei, ma anche i prescapolari e i sottomascellari (Lima *et al.*, 2004).

Le alterazioni dermatologiche sono rappresentate da quadri di dermatite esfoliativa non pruriginosa con o senza alopecia, che può essere localizzata o disseminata, dermatite erosiva-

ulcerosa, dermatite nodulare papulare o pustolosa, depigmentazione o ipercheratosi del tartufo e onicogrifosi.

Altri segni clinici che si riscontrano con una certa frequenza sono dimagrimento, disoressia, enterite cronica, splenomegalia ed epatomegalia, epistassi, ipotrofia muscolare ed alterazioni oftalmologiche di varia natura e gravità (Eguchi *et al.*, 2017; Di Pietro *et al.*, 2016; Koutinas & Koutinas 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Peña *et al.*, 2000; 2008).

Si segnalano, inoltre, segni neurologici (Zobba *et al.*, 2017; Márquez *et al.* 2013; Font *et al.*, 2004) e infiammazioni a carico delle articolazioni, che si presentano sotto forma di artriti e poliartriti (Sbrana *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2006) (Tabella 1).

Tutti i cani affetti da Leishmaniosi possono sviluppare glomerulonefrite, un processo infiammatorio a livello renale determinato dalla deposizione di immunocomplessi nel glomerulo; ciò porta, nel medio-lungo periodo, alla comparsa di una insufficienza renale cronica, che rappresenta la causa di morte più comune nei cani malati (Roura *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

I pazienti affetti da leishmaniosi vengono classificati con dei sistemi di stadiazione clinica della malattia, che indirizzano nello stabilire diagnosi, prognosi e trattamento più adeguati (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

In particolare, il gruppo LeishVet classifica la malattia in quattro fasi evolutive: stadio I in cui la malattia è lieve; stadio II in cui la malattia è moderata, stadio III in cui la malattia è grave; stadio IV dove la malattia è molto grave (Tabella 2). Lo stadio II è ulteriormente suddiviso in sottostadi: IIa e IIb, cani nefropatici non proteinurici o proteinurici in base al rapporto proteine urinarie creatinina urinaria (PU/CU). Gli stadi III e IV comprendono, invece, i cani inquadrati rispettivamente negli stadi I e II e negli stadi III e IV del sistema IRIS (*International Renal Interest Society*, <http://iris-kidney.com>).

Questa classificazione si basa sui riscontri derivanti dall'esame clinico, sul livello di anticorpi specifici ricercati mediante immunofluorescenza indiretta e sui risultati delle analisi

emato-biochimiche, comprese quelle relative alla funzionalità renale valutate secondo le linee guida dell'IRIS (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Esiste, tuttavia, un ulteriore sistema di stadiazione elaborato dal gruppo di lavoro sulla leishmaniosi canina (CLWG, *Canine Leishmaniasis Working Group*), che inquadra i pazienti in quattro stadi in base alle lesioni clinico-patologiche e ai risultati delle diagnosi sierologica e parassitologica, definendoli come: A) cane esposto; B) cane infetto; C) cane malato e D) cane malato con quadro clinico grave (Tabella 3) (Paltrinieri *et al.*, 2010; Roura *et al.*, 2013).

1.7 Diagnosi

Il sospetto diagnostico di leishmaniosi canina deve sempre sorgere in presenza di rilievi anamnestici (dimagrimento, cambiamento della facies), clinici (dermatite furfuracea, linfadenomegalia, onicogrifosi, ecc.) e di laboratorio (anemia, iperglobulinemia, ipoalbuminemia, proteinuria) compatibili con la malattia.

In un corretto iter diagnostico, tra gli esami di laboratorio da eseguire si ricordano: esame emocromocitometrico, protidemia totale e frazionata, uremia e creatininemia, enzimi epatici ed esame delle urine completo.

Gli esami specifici che permettono di diagnosticare la presenza dell'agente eziologico in maniera diretta e/o indiretta sono classificati in esami parassitologici, molecolari e immunologici.

Esami parassitologici

Essi si basano sull'identificazione diretta del parassita, ovvero degli amastigoti, liberi o all'interno dei macrofagi, in preparati citologici che possono essere ottenuti da sangue intero, (Giudice & Passantino 2011; Di Pietro *et al.*, 2020) biopsia cutanea, agoaspirato linfonodale, splenico, midollare o epatico (Gomes *et al.*, 2008).

L'aspirato splenico solitamente non è consigliato per le possibili complicazioni emorragiche legate alla sua realizzazione, nonostante sia l'esame più sensibile in assoluto, seguito

da quello midollare, che ha una sensibilità di circa il 60-85% (Barrouin-Melo *et al.*, 2004) e, infine, da quello linfonodale con sensibilità del 30-40% (Sundar & Rai, 2002).

L'immunoistochimica può risultare più sensibile rispetto all'esame citologico nei soggetti con bassa carica parassitaria nei quali, talvolta, quest'ultimo può dare esiti falsamente negativi.

Infine, possiamo considerare l'esame colturale, che si effettua ponendo i suddetti substrati in terreni di coltura specifici, come ad esempio il Novy-McNeal-Nicolle (NNN) ed altri. Questo esame permette l'isolamento del ceppo responsabile dell'infezione, anche se, ai fini diagnostici esso è considerato poco pratico, a motivo dei lunghi tempi per ottenere l'esito, della bassa sensibilità rispetto alle tecniche molecolari e della laboriosità della metodica.

Esami molecolari

Le tecniche di biologia molecolare rispetto ad altri esami sono dotate di una maggiore specificità e sensibilità; esse mettono in evidenza nei campioni biologici la presenza di uno specifico segmento di DNA del parassita tramite amplificazione in vitro.

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e la PCR quantitativa (qPCR) o *real-time* PCR possono essere utilizzate per l'analisi di un'ampia varietà di substrati, come sangue periferico, aspirato di midollo osseo o linfonodi, frammenti di cute, urine e altri campioni (Silva *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007, 2011), sia freschi che fissati in formalina o paraffina (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Roura *et al.*, 1999).

Queste tecniche sono ormai routinarie negli iter diagnostici per questa malattia e permettono la diagnosi anche negli stadi più precoci; esse sono più sensibili rispetto all'osservazione diretta del parassita e della sierologia e risultano alquanto utili anche per monitorare il decorso della malattia durante e dopo il trattamento.

È comunque importante precisare che le informazioni ottenute grazie alla PCR e qPCR devono sempre essere affiancate dalle valutazioni clinico-patologiche e sierologiche (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Esami immunologici

I metodi sierologici si basano sulla ricerca di anticorpi specifici anti-*Leishmania* su siero, consentendo di diagnosticare in maniera indiretta la presenza del parassita in un soggetto.

Tra le tecniche sierologiche disponibili, quelle usate più frequentemente sono l'immunofluorescenza indiretta (*Immuno-Fluorescence Antibody Test*, IFAT) e l'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

L'IFAT evidenzia la presenza di IgG dirette verso la *Leishmania*, mediante l'uso di anticorpi secondari marcati con fluorocromi, la cui reazione è visualizzata attraverso l'utilizzo di microscopi a fluorescenza.

L'ELISA, invece, è una tecnica immunoenzimatica che si basa sulla reazione tra anticorpi specifici del siero, verso antigeni solubili di *Leishmania* adsorbiti su piastre e antiglobuline di cane coniugate con un enzima responsabile della reazione colorimetrica, quantificata mediante uno spettrofotometro.

I risultati di questi test sono interpretati come positivi, negativi o dubbi, in relazione all'indice di *cut-off* stabilito per la leishmaniosi (Ferroglia & Vitale, 2006), in accordo con quanto indicato dall'Organizzazione Internazionale delle Epizootie (OIE) e dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Nonostante nella routine clinica siano tra le metodiche più ampiamente adoperate, i test sierologici presentano alcune limitazioni come la scarsa sensibilità.

Secondo Solano-Gallego *et al.*, (2009) un titolo anticorpale alto è ritenuto diagnostico di leishmaniosi canina, mentre nel caso sia basso sono necessari ulteriori approfondimenti, con altri metodi diagnostici, per confermare o escludere la malattia (Miro *et al.*, 2008).

Inoltre, nelle aree endemiche l'uso di un'unica metodica senza altri accertamenti diagnostici è sconsigliato, in quanto cani resistenti o sani, che precedentemente sono venuti a contatto con il parassita, possono risultare falsamente positivi (Mancianti *et al.*, 1988).

Nella pratica veterinaria, infine, vengono impiegati per la diagnosi di varie malattie tra cui anche la leishmaniosi i test rapidi immunocromatografici, pratici e facili da eseguire, anche se va sempre considerato che essi hanno un valore puramente indicativo.

1.8 Risultati degli esami di laboratorio

Una delle principali alterazioni che possono derivare dall'esame emocromocitometrico è l'anemia di tipo normocitico normocromico non rigenerativa, nella cui genesi possono essere sospettati uno stato infiammatorio cronico e/o la compromissione dell'eritropoiesi per il danno renale e/o midollare.

Un altro reperto molto importante è l'alterazione del protidogramma con iperglobulinemia e ipoalbuminemia e conseguente inversione del rapporto albumina/globuline (Ribeiro *et al.*, 2013). L'aumento delle proteine totali è dovuto alla marcata risposta umorale, che deriva da un significativo aumento delle γ -globuline, e spesso anche delle α e β globuline, con conseguente comparsa di un tracciato definito comunemente "a orecchie di gatto", per la sua caratteristica forma. L'ipoalbuminemia può essere correlata o al danno glomerulare causato dalla malattia, che provoca l'escrezione della proteina attraverso le urine, e/o alla sua minore sintesi per alterazione della funzionalità epatica.

Il profilo renale nei cani leishmaniotici può mostrare alterazioni clinico-laboratoristiche quali lieve proteinuria, sindrome nefrosica o insufficienza renale cronica, che deriva da una glomerulonefrite generalmente associata alla deposizione di immunocomplessi.

In alcuni casi possono essere alterati anche gli enzimi epatici (aspartato aminotransferasi AST, alanina aminotransferasi ALT e fosfatasi alcalina ALP), a motivo della comparsa di una compromissione epatica.

1.9 Terapia

La terapia ha lo scopo di ridurre la carica parassitaria per ottenere quanto più possibile la remissione dei sintomi clinici e delle alterazioni clinico-patologiche e la diminuzione della contagiosità per i vettori, oltre a quello di gestire eventuali recidive (Oliva *et al.*, 2011).

I protocolli terapeutici maggiormente diffusi in medicina veterinaria per controllare la LCan prevedono l'impiego, singolarmente o in associazione, di molecole quali gli antimoniali pentavalenti, la miltefosina e l'allopurinolo. Oltre a queste molecole, altri prodotti vengono proposti per modulare la risposta immunitaria, come ad esempio domperidone, alcune citochine e i vaccini. L'allopurinolo ha un'azione parassitostatica e viene anche usato in monoterapia. I composti antimoniali pentavalenti e la miltefosina hanno invece effetto parassiticida.

Il protocollo terapeutico più frequentemente impiegato per la leishmaniosi canina è rappresentato dall'associazione di antimonio di meglumina, somministrato per via sottocutanea, intramuscolare o endovenosa alla dose di 50 mg/kg due volte al giorno per 4-8 settimane, e di allopurinolo, somministrato per via orale alla dose di 10 mg/kg ogni 12 ore per un minimo di sei mesi (Manna *et al.*, 2015; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

La durata della terapia è variabile e dipende dalla gravità della malattia, dalla tolleranza individuale ai farmaci somministrati e dalla risposta clinica al trattamento, ma solitamente il trattamento si prolunga per almeno 45-60 giorni.

Gli effetti collaterali sono rappresentati da xantinuria, urolitiasi e mineralizzazione renale per l'allopurinolo, nefrotossicità per l'antimonio di meglumina e disturbi gastrointestinali di gravità variabile per la miltefosina (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2016).

In soggetti affetti da malattia renale è risultata ottimale l'associazione dell'allopurinolo con la miltefosina.

Il domperidone (0,5 mg/kg PO SID per 30gg e ripetizione del ciclo ogni 4 mesi), potenzia la risposta immunitaria di tipo cellulo-mediata e riduce il rischio di sviluppare la forma clinicamente manifesta della malattia (Sabaté *et al.*, 2014).

1.10 Prevenzione e controllo

La prevenzione si basa sulla protezione del cane contro la puntura del flebotomo attraverso barriere fisiche, barriere chimiche (sostanze con attività repellente) e atteggiamenti precauzionali, come la limitazione dell'esposizione dell'animale al flebotomo durante le ore crepuscolari e notturne.

Tuttavia, queste misure non forniscono una protezione totale contro l'infezione; pertanto, è preferibile che esse siano affiancate dalla vaccinazione, la quale fa sì che il cane sviluppi una risposta immunitaria adattativa precedentemente al contatto naturale con il protozoo, tale da essere in grado di combattere l'infezione.

I prodotti repellenti ed insetticidi in commercio sono formulazioni a base di piretroidi sintetici (deltametrina, permetrina o flumetrina) e sostanze insetticide, che hanno il duplice effetto di allontanare il vettore e causarne la morte in caso di contatto (Maroli *et al.*, 2010; Quinnell & Courtenay, 2009). L'effetto protettivo di tali prodotti è variabile, può durare da 2-4 settimane per le formulazioni *spot-on* a 4-8 mesi per i collari impregnati, la cui applicazione deve essere però regolare, sia in animali non infetti che infetti (Brianti *et al.*, 2014; Otranto *et al.*, 2010).

L'effetto della vaccinazione è quello di far sviluppare all'organismo ospite una risposta immunitaria di tipo Th1, con produzione di IL-12 e IFN- γ , essendo questa una risposta maggiormente protettiva verso la malattia, come già detto a proposito della patogenesi.

In Italia, il primo vaccino contro la leishmaniosi autorizzato per l'uso nel cane (CaniLeish®) nasce nel 2011 e nel 2016 viene introdotto un secondo vaccino il "Letifend®", che ha come aspetto altamente vantaggioso quello di non interferire a livello diagnostico con i casi di infezione naturale (Wylie *et al.*, 2014).

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Le varie specie di protozoi appartenenti al genere *Leishmania* sono capaci di parassitare le cellule della linea dei fagociti mononucleati (Alexander *et al.*, 1992), delle cellule dendritiche (Moll *et al.*, 1993) e dei neutrofili (van Zandbergen G *et al.*, 2004), sebbene le cellule target siano i macrofagi. L'immunità nei confronti di *Leishmania* è principalmente mediata dalle cellule T, per cui sembrerebbe che la risposta cellulare Th1 è associata con immunità protettiva e con la risoluzione della malattia, mentre la risposta cellulare Th2 è associata ad una maggiore suscettibilità alla malattia e alla sua relativa esacerbazione (Alexander *et al.*, 2005).

Gli ormoni sessuali come gli androgeni, gli estrogeni e il progesterone possono interagire direttamente con le cellule del sistema immunitario, regolando e/o alterando la risposta immunitaria. Le due principali linee cellulari coinvolte nell'insorgenza della leishmaniosi, macrofagi e linfociti, possiedono recettori per gli ormoni sessuali e di conseguenza la loro attività risulta influenzata da questi ultimi. In particolare, macrofagi e cellule T posseggono recettori per gli androgeni (Cutolo *et al.*, 1996; Wunderlich *et al.*, 2002; Benten *et al.*, 1999), gli estrogeni (Danel *et al.*, 1983) e il progesterone (Jones *et al.*, 2008; Piccinni *et al.*, 2000).

Diversi studi hanno evidenziato come il testosterone e il progesterone svolgano un effetto immunosoppressore, contrariamente agli estrogeni, rendendo plausibile quanto descritto per le infezioni da *Leishmania* nell'uomo, dove si riscontra una maggiore suscettibilità alla malattia negli individui di sesso maschile (Sinder *et al.* 2009). In uno studio effettuato in Messico, su una popolazione di pazienti affetti da *L. mexicana*, solo il 10% di questi era di sesso femminile (Lezama-Davila *et al.*, 2007); un altro studio condotto in Colombia su *Leishmania mexicana*, mostrava come i maschi presentassero forme cliniche più gravi delle femmine (Munoz *et al.*, 2006).

Ancora, studi effettuati su criceti infettati sperimentalmente con *L. donovani* e sottoposti a orchietomia, mostravano una riduzione della carica parassitaria, contrariamente a criceti trattati con testosterone sintetico, che mostravano anche un peggioramento dei segni clinici (Anuradha *et al.*, 1990).

Sulla base delle suestasposte considerazioni, l'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare il ruolo del trattamento con un agonista del GnRH (deslorelina acetato), sotto forma di impianto sottocutaneo (Suprelorin®), in associazione con meglumina antimoniato e allopurinolo, nel ridurre i segni clinici della malattia e il titolo sierologico in cani naturalmente affetti da *Leishmania infantum*.

Al fine di comprendere meglio il meccanismo d'azione della deslorelina si è ritenuto opportuno effettuare alcuni cenni sugli aspetti farmacologici della suddetta molecola.

DESLORELINA

L'impianto a rilascio di deslorelina acetato (DRI, Suprelorin®) è stato sviluppato in Australia ed è attualmente commercializzato da Virbac (Carros, Francia) in due versioni. L'impianto da 4,7 mg, etichettato per sopprimere la fertilità nei cani maschi sessualmente maturi per un minimo di 6 mesi, è approvato per la vendita in Australia, Unione Europea (UE), Nuova Zelanda, Cina e Messico. È stato lanciato in Australia e Nuova Zelanda nel 2007 e nell'UE nel 2008. L'approvazione in Cina e Messico è avvenuta alla fine del 2019, con un lancio nel 2020. L'impianto da 9,4 mg, etichettato per sopprimere la fertilità nei cani maschi sessualmente maturi per un minimo di 12 mesi, è approvato e venduto in Australia e nell'UE (EMA, 2010). Il DRI è posizionato sotto la cute tra le scapole del cane; non è necessario preparare il sito di impianto. Il prodotto può essere ripetutamente applicato per prolungare il periodo di soppressione della fertilità. L'impianto è confezionato in un dispositivo a siringa sterile monouso-con-una durata di conservazione di 3 anni. Il prodotto deve essere conservato in frigorifero (2–8 ° C o 36–46 ° F) e non congelato (EMA, 2008).

Meccanismo d'azione

Il GnRH è un decapeptide ipotalamico, che agisce nella parte superiore della cascata che coordina la funzione dell'asse gonadico ipotalamo-ipofisario. Esso viene rilasciato da specifici neuroni che producono GnRH in modo pulsante. Questo modello pulsatile di rilascio stimola la produzione e il rilascio dalla ghiandola pituitaria delle due gonadotropine chiave, l'ormone follicolo stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH), che a loro volta controllano la funzione gonadica (nei maschi, la produzione di testosterone e la produzione di cellule germinali, cioè, la differenziazione degli spermatogoni in spermatozoi). La deslorelina, come antagonista del GnRH, presenta una sequenza peptidica correlata alla sequenza del GnRH nativo con modifiche di tre dei suoi amminoacidi (nelle posizioni 1, 6 e 9) e delezione del suo amminoacido nella posizione 10. Lo scopo di questi cambiamenti strutturali è ridurre la sensibilità alla proteolisi e aumentare l'attività biologica (Padula, 2005). Ad esempio, è stato riscontrato che la deslorelina mostra una potenza 10 o 100 volte superiore al GnRH nativo in un test di legame al ligando del GnRH e in una coltura in vitro di cellule ipofisarie di ratto, rispettivamente (Padula, 2005).

Lo scopo degli impianti utilizzati per i cani è garantire il rilascio del loro contenuto di agonisti del GnRH (deslorelina) per periodi prolungati. Le concentrazioni plasmatiche di deslorelina raggiungono il picco ~ 14 giorni (200 e 2.000 pg / ml) dopo l'inserimento di un impianto da 4,7 mg, per diminuire gradualmente fino a raggiungere valori non rilevabili 80 giorni circa dopo l'impianto (Navarro *et al.*, 2012).

L'esposizione continua delle cellule ipofisarie al GnRH innesca la desensibilizzazione ipofisaria, l'internalizzazione dei recettori del GnRH (che non sono più presenti per il legame sulla superficie cellulare) e l'inattivazione della cascata di segnalazione intracellulare. Una volta avviata la desensibilizzazione delle cellule ipofisarie al GnRH, le concentrazioni di LH scendono a valori non rilevabili e quindi non supportano la produzione di testosterone e sperma.

Reversibilità del trattamento con Deslorelina

La durata dell'efficacia di 4,7 - mg e 9,4 - mg di deslorelina GnRH A - SRI è compresa tra i 180 e i 400 giorni (Trigg *et al.*, 2006). Per deslorelina GnRH A - SRI da 4,7 mg, sono state riportate differenze nella durata dell'efficacia a seconda del peso corporeo del cane, con una durata media di circa 420 giorni (intervallo: 200-560 giorni) nei cani <10 kg (dosaggio medio 0,76 mg deslorelina / kg, intervallo 0,54-1,32 mg deslorelina / kg), di circa 280 giorni (intervallo: 160-500 giorni) nei cani tra i 10-25 kg (dose media 0,26 mg deslorelina / kg, intervallo 0,22-0,33 mg deslorelina / kg) e di circa 290 giorni (intervallo: 180-400 giorni) nei cani > 25 kg (media 0,15 mg di deslorelina / kg, 0,11-0,20 mg di deslorelina/kg) (Trigg *et al.*, 2006). Tutti gli effetti indotti del GnRH A - SRI sono considerati completamente reversibili, in quanto LH, FSH raggiungono le concentrazioni pre-trattamento entro poche settimane dalla fine dell'efficacia o dalla rimozione dell'impianto (Goericke Pesch *et al.*, 2017; Junaidi *et al.*, 2003, 2009a; 2009b; Ludwig *et al.*, 2009).

La spermatogenesi e la sovraregolazione dell'apparato steroidogenico si normalizzano rapidamente (Goericke Pesch *et al.*, 2017) entro 9 settimane dopo la rimozione del GnRH A - SRI (Goericke Pesch *et al.*, 2017), mentre la qualità del seme normale si identifica fra 6 e 16 settimane dopo la fine dell'efficacia di un GnRH A - SRI da 6 mg (Junaidi *et al.*, 2003; Trigg *et al.*, 2006).

4. MATERIALI E METODI

4.1 Animali

Per lo studio oggetto della presente tesi sono stati arruolati n. 31 cani maschi di proprietà, appartenenti a diverse razze ed età, di cui alcuni portati a visita presso l'Ospedale Veterinario Didattico dell'Università degli Studi di Messina, altri ospitati presso il canile rifugio “Millemusi” di Messina (ME) e/o presso il canile “Rifugio sanitario e per il ricovero di Petralia Sottana e Isnello” (PA).

Sebbene siano stati considerati idonei 31 cani, solo 23 sono stati inclusi nel presente studio, così come evidenziato nella Figura n. 2.

Successivamente un cane moriva per arresto cardiorespiratorio a causa di un'insufficienza cardiaca cronica e, pertanto, il gruppo DES risultava costituito da 10 cani e il gruppo CTR da 12 animali. Le razze di cani incluse nei gruppi DES/CTR erano le seguenti: Pitbull (1/2), Pastore Tedesco (1/0), Labrador Retriever (2/1), Meticcio (2/6), Dogo Argentino (0/1), Jack Russell (2/0), Segugio (1/0), Beagle (1/0), Setter inglese (0/1).

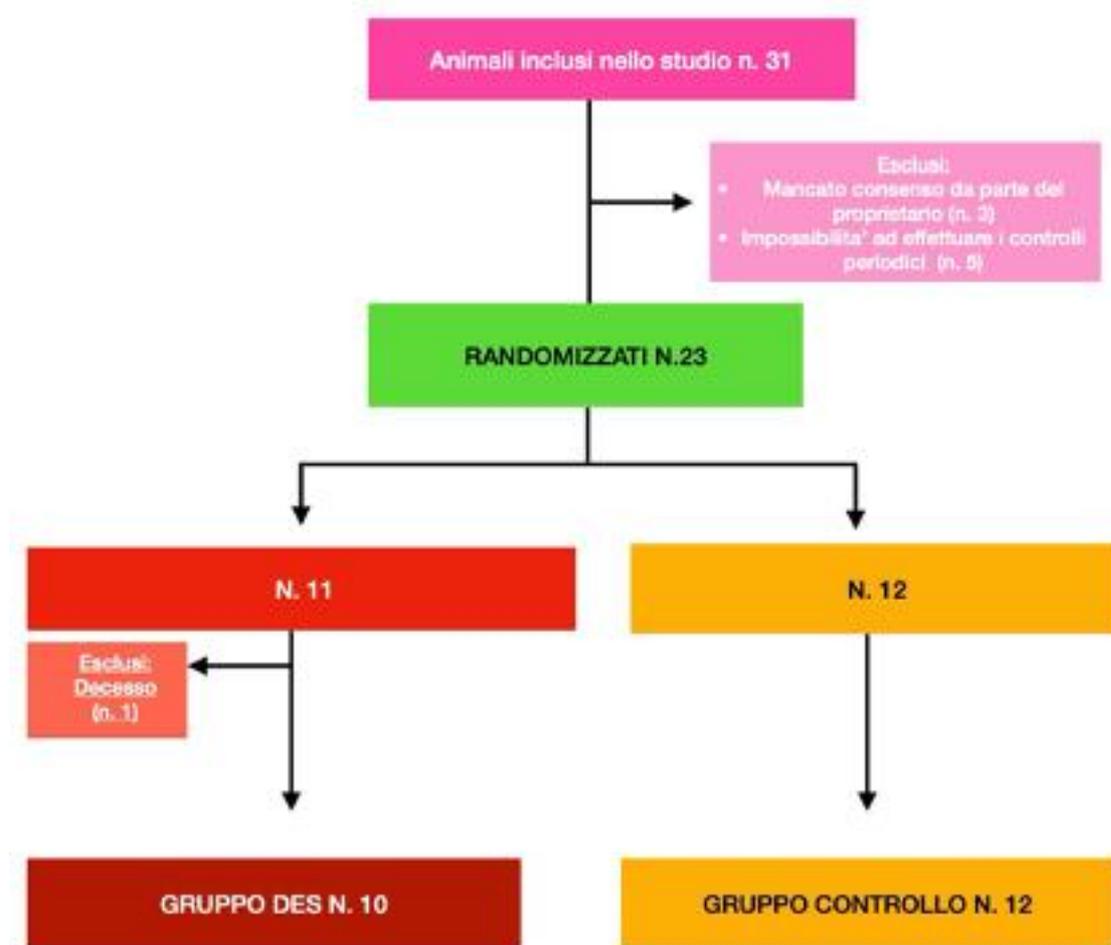


Figura 2 - Diagramma di flusso relativo all'arruolamento dei cani

I criteri scelti per l'inclusione nello studio sono stati:

- la presenza di un titolo anticorpale superiore a 1:320 all'immunofluorescenza indiretta (IFAT) (cut off 1:80) (Mancianti *et al.*, 1988);
- l'evidenziazione diretta degli amastigoti di *Leishmania* spp. su strisci di aghi aspirati linfonodali;
- la presenza di segni clinici e/o alterazioni degli esami di laboratorio secondo il sistema di classificazione del gruppo di studio LeishVet, indicativi della parassitosi (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Sono stati esclusi dallo studio cani vaccinati per leishmaniosi e/o già trattati con allopurinolo, antimonio di meglumina, miltefosina, domperidone, ciclosporina, glucocorticoidi ed integratori. Sono stati, inoltre, esclusi tutti gli animali con concomitanti patologie endocrine e malattie trasmesse da vettori quali l'ehrlichiosi (*Ehrlichia canis*) e la babesiosi (*Babesia canis*), diagnosticate tramite IFAT ed esame microscopico diretto su strisci di sangue intero.

Lo studio era stato approvato dal Comitato Etico del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Messina (approvazione n. 22 del 9/06/2018), previa sottoscrizione di un consenso informato da parte dei proprietari degli animali, nonché del direttore sanitario dei canili.

4.2 Raccolta di campioni

Per lo studio sono stati raccolti campioni di sangue, urine e linfonodali.

I campioni di sangue sono stati raccolti tramite prelievo dalla vena giugulare o cefalica e posti in provette contenenti acido etilendiamminotetracetico (EDTA), litio eparina o provette con separatore di siero a seconda dei parametri da analizzare.

I campioni di sangue dai quali si doveva ricavare il siero sono stati lasciati coagulare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25 °C) e centrifugati a 3.000 g × 20 minuti (ALC 4235 A, Milano, Italia). I campioni di siero ottenuti dopo la centrifugazione sono stati divisi in più aliquote e conservati a -20° C, fino al momento dell'analisi.

I campioni di urine venivano prelevati, preferibilmente al mattino, esclusivamente tramite cistocentesi.

Il materiale linfonodale per l'evidenziazione diretta del parassita (sotto forma di amastigoti all'interno del citoplasma dei macrofagi o liberi nel campione) veniva prelevato tramite ago-aspirato linfonodale, in genere dai linfonodi prescapolari o poplitei.

4.3 Valutazione clinica

Per la valutazione dei segni clinici attribuibili all'infezione da *Leishmania* è stato utilizzato un punteggio numerico, in accordo con quanto riportato da Solano-Gallego *et al.* (2011) (Tabella 4).

4.4 Test di laboratorio

Le valutazioni ematologiche includevano un esame emocromocitometrico completo, eseguito tramite contaglobuli automatico (Procyte Dx Hematology Analyzer, IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, USA). I parametri valutati erano: globuli rossi (*Red Blood Cells*, RBC), ematocrito (HCT), volume corpuscolare medio (*Mean Corpuscular Volume*, MCV), concentrazione di emoglobina (HGB), emoglobina corpuscolare media (*Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH), concentrazione di emoglobina corpuscolare media (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC), reticolociti, piastrine (*Platelets*, PLT), distribuzione del volume dei globuli rossi (*Red cell Distribution Width*, RDW), ampiezza di distribuzione delle piastrine (*Platelets Distribution Width*, PDW), volume piastrinico medio (*Mean Platelet Volume*, MPV), globuli bianchi (*White Blood Cells*, WBC) e conta differenziale dei globuli bianchi.

I parametri biochimici, effettuati con Catalyst Dx (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, USA), includevano: alanina aminotransferasi (ALT), fosfatasi alcalina (ALP), glucosio (GLU), azoto ureico (BUN), proteine totali (PT), albumina (ALB), creatinina (CREA).

L'urina, valutata entro 30 minuti dal prelievo, prevedeva un esame fisico-chimico e microscopico del sedimento urinario. Veniva, altresì, effettuata la valutazione del rapporto PU/CU (Catalyst Dx, Idexx).

L'IFAT veniva eseguita utilizzando promastigoti di *L. infantum* fissati su vetrini multi-spot, prodotti dal C.Re.Na.L (IZS "A. Mirri", Palermo, Italia), secondo la metodica descritta da Otranto *et al.* (2010). I campioni di siero venivano considerati positivi quando producevano una chiara fluorescenza a livello del citoplasma e della membrana degli amastigoti ad una diluizione di 1:80 (Otranto *et al.*, 2010), utilizzando coniugati specifici per la specie canina (anti-dog IgG, Sigma Aldrich, Milano, Italia).

Le concentrazioni sieriche di testosterone sono state dosate attraverso metodo immunologico basato sui principi del test ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) con sistema Mini VIDAS (BioMerieuxSA, Lione, Francia).

4.5 Protocollo di trattamento

I cani inclusi nello studio sono stati divisi in maniera *random* in due gruppi, gruppo controllo (CTR, n. 12) e gruppo deslorelina (DES, n. 10).

I cani del gruppo CTR venivano trattati con allopurinolo (Allopurinolo®, Sandoz, S.P.A.), alla dose di 10 mg/kg p.c. PO BID per sei mesi, associato ad N-metilglucamina antimoniato iniettabile (Glucantime®, Boehringer Ingelheim Animal Health) alla dose di 50 mg/kg p.c. SC BID per 28 giorni.

I cani del gruppo DES, oltre ad essere trattati con allopurinolo e N-metilglucamina antimoniato, allo stesso dosaggio del gruppo CTR, venivano sottoposti ad un impianto sottocutaneo di deslorelina acetato (Suprelorin® Sc 4,7 mg, Virbac, Carros-Cedex, Francia), localizzato tra la parte inferiore del collo e l'area lombare secondo il bugiardino (https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/suprelorin-epar-product-information_it.pdf).

Su tutti gli animali arruolati veniva effettuata prima dell'inizio del trattamento (D0), al giorno 90 (D90) e alla fine dello studio al giorno 180 (D180) una visita clinica con attribuzione del clinical score, nonché la valutazione del titolo anticorpale e delle concentrazioni di testosterone.

4.6 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il pacchetto SPSS per Windows (versione 17.0, SPSS, Inc., Chicago, USA). È stata calcolata la media e la deviazione standard del clinical score (CS), del titolo sierologico IFAT e delle concentrazioni del testosterone, di cui è stata valutata la distribuzione normale dei dati parametrici, utilizzando il test D'Agostino-Pearson.

All'interno di ciascun gruppo è stata, altresì, valutata la differenza statisticamente significativa tra D0 vs D90 vs D180, relativamente alle variabili considerate (clinical score, titolo IFAT e concentrazione del testosterone) mediante il test Mann-Whitney.

Per la determinazione della relazione tra le diverse variabili, è stato utilizzato il rank test di Spaerman. La significatività è stata fissata a $P > 0,05$.

5. RISULTATI

Le caratteristiche di base della popolazione inclusa nello studio sono riportate in Tabella 5.

Nessun effetto collaterale o avverso è stato riscontrato nel gruppo DES.

Al controllo basale (D0) non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi per quanto riguarda età media, temperatura, peso corporeo, score clinico ed concentrazione basali di testosterone (Tabella 5).

Sette/10 (70%) dei cani appartenenti al gruppo DES erano inclusi nello stadio clinico IIa, 5/10 (50%) dei cani nello stadio IIb e 3/10 (30%) nello stadio III, mentre 1/11 (9%) dei cani del gruppo CTR rientravano nello stadio IIa, 4/10 (36%) nello stadio IIb e 6/11 (54%) nello stadio III (gruppo di studio LeishVet).

Nessuna variazione significativa è stata registrata durante lo studio, invece, nella temperatura e nel peso corporeo in nessuno dei due gruppi.

Dopo 180 giorni dall'inserimento dell'impianto di deslorelina acetato è stato osservato uno score clinico significativamente più basso nel gruppo DES a D0 vs D90 (15,3 +/- 6,3 vs 7,7 +/- 5,9; P=0,03), a D0 vs D180 (15,3 +/- 6,3 vs 2,8 +/- 4,3; P <0,01), a D90 vs D180 (7,7 +/- 5,9 vs 2,8 +/- 4,3; P <0,01). Uno score clinico significativamente più basso è stato registrato nel gruppo DES rispetto al CTR a D90 e D180 (7,7 +/- 5,9 vs 9,1 +/- 4,3; P <0,01 e 2,8 +/- 4,3 vs 5,2 +/- 4,1; P <0,01 rispettivamente) (Grafico 1).

Una significativa riduzione dei livelli medi dei titoli sierologici (IFAT) è stata osservata nel gruppo DES durante lo studio (D0 vs D90, P = 0,05; D0 vs D180, P = 0,04; D90 vs D180, P = 0,03) (Grafico 2). In particolare, confrontando i due gruppi, nel gruppo DES a D180 è stato riscontrato un titolo anticorpale medio significativamente inferiore rispetto al gruppo CTR (P=0,03). Inoltre, 6/10 (60%) cani appartenenti al gruppo DES mostravano una riduzione del titolo anticorpale di più di un quarto della diluizione.

Una notevole riduzione dei livelli sierici di testosterone è stata osservata nel gruppo DES a D0 vs D90 (3,8 +/- 1,6 vs 0,18 +/- 0,45; P = 0,01), D0 vs D180 (3,8 +/- 1,6 vs 0,17 +/- 0,40; P=0,01) e D90 vs D180 (0,18 +/- 0,45 vs 0,17 +/- 0,40; P=0,01).

Nessuna variazione statisticamente significativa del testosterone è stata osservata nel gruppo CTR durante lo studio.

Non era infine evidenziabile nessuna correlazione staticamente significativa tra i clinical score, i livelli sierici di testosterone e i titoli sierologici (IFAT) all'interno dei due gruppi.

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I parassiti hanno sviluppato vari meccanismi di adattamento per sopravvivere all'interno dei mammiferi, come ad esempio l'evasione dal sistema immunitario e lo sfruttamento di molecole utili al loro sviluppo (Escobedo *et al.*, 2004). Questi meccanismi transregolatori permettono ai parassiti di beneficiare direttamente delle sostanze ormonali e dei fattori di crescita prodotti dall'ospite, necessari per la rapida insorgenza dell'infezione parassitaria (Nava-Castro *et al.*, 1997).

La resistenza del parassita può essere influenzata dall'interazione con l'ospite anche attraverso processi adattativi che hanno consentito al parassita di sfruttare il sistema endocrino dell'ospite per la sua sopravvivenza e crescita (Beckage, 1997). Le principali interazioni ospite-parassita sono oggetto di un complesso sistema neurormonale, che vede coinvolti più ormoni. Esempio di questo complesso meccanismo è rappresentato dall'infezione da cisticerco (*Taenia crassiceps*), dove è stato evidenziato che i livelli di testosterone sono negativamente correlati alla riproduzione del parassita, alla sua proliferazione e alla sua sopravvivenza, suggerendo che gli androgeni esplicano un effetto tossico sul parassita (Ambrosio *et al.*, 2015). Dunque, sembrerebbe che il testosterone abbia un effetto diretto sull'integrità del DNA del parassita, probabilmente attraverso meccanismi di apoptosi programmata (Escobedo *et al.*, 2004, Ghansah *et al.*, 2002).

Altri esempi legati all'influenza degli ormoni sull'attività dei parassiti sono stati anche riportati per *Schistosoma haematobium*, per il quale è stata dimostrata l'inibizione della sua riproduttività indotta dal diidrotestosterone, metabolita biologicamente attivo del testosterone (Remoué *et al.*, 2002). Allo stesso modo sono state descritte infezioni con quadri clinici più gravi in soggetti maschi rispetto alle femmine positive a *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* (Flegr *et al.*, 2005)

La leishmaniosi comprende un gruppo vario di patologie con diversi quadri clinici sia nell'uomo che nel cane, la cui manifestazione è strettamente correlata sia alle specie di leishmania

parassitante, quanto a fattori strettamente correlati allo stato generale dell'ospite (Roberts *et al.*, 2001). Infatti, in letteratura sono riportate numerose osservazioni dimostranti che l'età, così come il sesso possono influenzare il corso dell'infezione, potendo sia gli ormoni maschili quanto quelli femminili, modulare la resistenza e la suscettibilità all'infezione (Roberts *et al.*, 2001). Così come alcuni studi (Alexander *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1996) hanno determinato un ruolo preponderante della risposta di tipo Th1 e Th2 nella resistenza o suscettibilità all'infezione da *Leishmania spp.*, allo stesso modo un ruolo fondamentale sarebbe svolto dagli ormoni sessuali (Roberts *et al.*, 2001)

Gli effetti degli ormoni sessuali non sono limitati agli organi riproduttori, ma si riflettono anche sulla risposta immunitaria sistemica dell'organismo. Gli ormoni associati al sesso e alla gravidanza influenzano, di fatto, la funzione di quasi tutta la popolazione delle cellule coinvolte nell'immunità; essi hanno effetti sulle cellule del sistema immunitario innato, come i mastociti, gli eosinofili, i macrofagi, le cellule dendritiche e le cellule Natural Killer, ma anche sulle cellule coinvolte nella risposta immunitaria adattativa, quali i linfociti T e B (Roberts *et al.*, 2001). Dalla letteratura si evince come il testosterone sopprima le risposte immunitarie adattive indotte di tipo Th2 e Th17, sopprimendo le funzioni associate alla loro differenziazione. In accordo con i risultati di Foo *et al.* (2016), per quanto riguarda le risposte di Th2 e Th17 è stato riscontrato che il testosterone riduce sia le risposte anticorpali, che la proliferazione delle cellule B nei monociti ed aumenta la produzione della citochina di tipo 1 IL-12 (Posma *et al.*, 2004).

Nelle cellule dendritiche, che svolgono un ruolo importante nell'immunità umorale, il testosterone inibisce le citochine di tipo 2 IL-4, IL-10 e IL-13 (Hepworth *et al.*, 2010) e le citochine Th17-inducenti quali IL-1 e IL-6 (Corrales *et al.*, 2009). Inoltre, alcuni studi che hanno valutato gli effetti del testosterone sui granulociti suggeriscono un effetto inibitorio di questo ormone sessuale sui neutrofili (Bekesi *et al.*, 2000). I nostri risultati hanno dimostrato un significativo miglioramento dei segni clinici e una significativa riduzione della risposta anticorpale nel gruppo trattato con la deslorelina acetato rispetto al gruppo di controllo, ponendosi in accordo con quanto

pubblicato ad oggi nell'uomo e in medicina sperimentale, sul paradigma esistente fra infezione da *Leishmania spp.* e ormoni sessuali. Esiste un consenso generale che l'immunità protettiva nei confronti di *Leishmania spp.* risulta essere correlata alla produzione di IL-12 da parte dei macrofagi e dalla produzione di IFN- γ da parte delle cellule Natural killer (NK) e dei linfociti CD4⁺ Th1. L'IFN- γ esplica la sua protezione attraverso il rilascio di ossido nitrico (NO), che svolge attività parassiticida.

Contrariamente, ancora poco chiari e documentati sono i meccanismi con cui si instaura il processo di guarigione, nonostante alcuni studi abbiano suggerito un ruolo cruciale nella risposta Th2, collegata ad un deficit nella produzione di IFN- γ e IL-12, e conseguentemente ad una maggiore suscettibilità all'infezione (Roberts *et al.*, 2001). Ad ogni modo, qualunque siano gli specifici processi che regolano il diverso tipo di risposta immunologica in corso di *Leishmania spp.*, sembrerebbe che gli ormoni sessuali possano influenzare la risposta immunitaria, rendendo i maschi più suscettibili alla malattia (de Beer *et al.*, 1991; Jahn *et al.*, 1996; Zaffaroni *et al.*, 1999).

Ciò è chiaramente riportato in uno studio sperimentale effettuato nel topo, dove similmente a quanto da noi riportato, l'orchietomia determinava una maggiore resistenza nei maschi rispetto alle femmine nei confronti di *Leishmania major* (Mock *et al.*, 1988). Contrariamente, è stato riportato come topi di sesso femminile, sperimentalmente infettati con *Leishmania mexicana*, erano più resistenti all'infezione (Alexander *et al.*, 1988), suggerendo che la maggiore predisposizione dei maschi rispetto alle femmine a sviluppare la malattia sarebbe da ricondurre alla capacità di queste ultime di produrre IFN- γ attraverso una risposta di tipo Th1 (Satoskar *et al.*, 1998; 1995). Un lavoro di Kobets *et al.* (2012) ha studiato le interazioni tra genotipo, differenze dipendenti dal sesso e risposte specie-specifiche in corso di infezione da *Leishmania spp.* (*L. major* e *L. tropica*) su modello murino. I risultati del suddetto studio hanno dimostrato che le femmine di topo infettate sperimentalmente hanno sviluppato piccole lesioni cutanee che sono poi regredite spontaneamente, mentre i maschi, pur non mostrando lesioni cutanee di grande entità, morivano per la maggior parte entro le 18 settimane. Infatti, si è visto che

le lesioni cutanee delle femmine non erano correlate alla carica parassitaria presente nei linfonodi drenanti, ma piuttosto ad altri fattori dell'ospite, come alcuni mediatori dell'infiammazione.

In Messico e in Colombia i dati raccolti da alcuni studi documentano una maggiore incidenza di leishmaniosi cutanea nei maschi rispetto alle femmine (Munoz & Davies, 2006). Anche i dati raccolti in Brasile mostrano che i maschi sviluppano manifestazioni cutanee più frequentemente delle femmine (Brilhante *et al.*, 2017; Turetz *et al.*, 2002). Inoltre, uno studio eseguito in Brasile ha evidenziato un aumento della CL nei maschi rispetto alle femmine di età inferiore ad un anno (Johannsen *et al.*, 2018). La predominanza nei bambini maschi potrebbe essere associata ad un aumento transitorio post-natale dei livelli di ormoni steroidei (Johannsen *et al.*, 2018). I dati complessivi mostrano che la prevalenza di leishmaniosi cutanea nei soggetti di genere maschile aumenta nella pubertà, raggiunge i livelli più alti nell'età adulta e diminuisce in età geriatrica.

Per quanto riguarda la leishmaniosi viscerale (*L. panamensis*) è stato intrapreso uno studio su topi maschi trattati con estrogeni e femmine trattate con testosterone dal quale si è concluso che le lesioni erano più pronunciate negli animali trattati con il testosterone, mentre in quelli trattati con estrogeni non si sono evidenziati effetti rilevanti. Inoltre, le lesioni dovute a *L. panamensis* si sviluppavano solo nei maschi adulti che avevano raggiunto la maturità biologica.

Concludendo, sulla base di quanto suesposto, i nostri risultati supportano il possibile utilizzo della deslorelina acetato quale adiuvante nel trattamento della leishmaniosi nel cane maschio e, di conseguenza, il suo possibile impiego nel trattamento multimodale della malattia (Oliva *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Tabella 1. Segni clinici in corso di leishmaniosi canina (Paltrinieri *et al.*, 2010, modificato)

E.O.G.	<ul style="list-style-type: none"> • Stato di nutrizione scadente fino alla cachessia • Ipotrofia muscolare • Letargia • Pallore delle mucose • Aumento di volume da lieve a moderato dei linfonodi esplorabili • Onicogrifosi • Facies da vecchio • Febbre • Epistassi
E.O.P. Lesioni cutanee mucocutanee e Lesioni oculari diffuse e/o nodulari Altre	<ul style="list-style-type: none"> • Epato-splenomegalia • Zoppie e tumefazioni articolari • Dermatite desquamativa (localizzata/generalizzata) • Dermatite ulcerativa con aspetto e distribuzione variabili • Dermatite nodulare/papulare • Lesioni nasali simil-lupus/pemfigo • Ipercheratosi naso-digitale • Blefariti • Congiuntiviti • Cheratocongiuntiviti • Cheratiti • Uveiti • Cheratouveiti • Episclerite e sclerite diffusa e/o nodulare • Glaucoma • Panoftalmite • Lesioni orbitali granulomatose, miositi dei muscoli estrinseci • Gastro-intestinali • Neurologiche

Tabella 2. Stadi della malattia (Solano-Gallego *et al.*, 2009)

STADIO	SIEROLOGIA	SEGN CLINICI	ALTERAZIONI DI LABORATORIO
STADIO I MALATTIA LIEVE	Livelli degli anticorpi negativi o bassi	Segni clinici lievi come linfadenomegalia o dermatite papulare	Di norma non sono osservate anomalie clinico patologiche Profilo renale normale: creatinina <1,4 mg/dl; non-proteinurico: PU/CU < 0,5
STADIO II MALATTIA MODERATA	Livelli di anticorpi da bassi ad alti	Cani che, oltre ai segni clinici elencati nello stadio I, possono presentare: lesioni cutanee diffuse o simmetriche come dermatite esfoliativa/onicogrifosi, ulcere (piano nasale, cuscinetti, prominenze ossee, giunzioni mucocutanee), anoressia, perdita di peso, febbre, ed epistassi	Anomalie clinico patologiche come leggera anemia non rigenerativa, iperglobulinemia, ipoalbuminemia, sindrome da iperviscosità ematica. Sottostadi a) Profilo renale normale: creatinina <1,4 mg/dl; non-proteinurico: PU/CU <0,5 b) Creatinina <1,4 mg/dl; PU/CU = 0,5-1
STADIO III MALATTIA GRAVE	Livelli di anticorpi da medi ad alti	Cani che, oltre ai segni elencati negli stadi I e II, possono presentare segni causati da lesioni da immunocomplessi: vasculite, artrite, uveite e glomerulonefrite.	- Anomalie clinico patologiche elencate nello stadio II. - Insufficienza renale cronica, stadio 1 IRIS con PU/CU >1 o stadio 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl)
STADIO IV MALATTIA MOLTO GRAVE	Livelli di anticorpi da medi ad alti	Cani con i segni clinici elencati nello stadio II. Tromboembolismo polmonare, o sindrome uremica e stadio finale della malattia renale	- Anomalie clinico patologiche elencate nello stadio II - Insufficienza renale cronica, stadio 1 IRIS con PU/CU >1 o stadio 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl)

Tabella 3. Stadi della malattia secondo il CLWG (*Canine Leishmaniasis Working Group*)

A	Esposto	Cane senza alterazioni clinico-patologiche dimostrabili, nel quale i test diagnostici parassitologici risultino negativi ma siano evidenziabili titoli anticorpali specifici, non superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento. I cani esposti solitamente soggiornano o hanno soggiornato in un'area dove è accertata la presenza dei flebotomi
B	Infetto	Cane senza alterazioni clinico-patologiche dimostrabili, nel quale è possibile mettere in evidenza il parassita, con metodi diretti (microscopia, coltura o PCR) e con metodi indiretti (presenza di anticorpi specifici).
C	Malato	Cane infetto, nel quale sia dimostrabile qualunque alterazione clinico-patologica riferibile a leishmaniosi e nel quale sia dimostrabile il parassita o titoli anticorpali superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento
D	Malato con quadro clinico grave	Cane malato affetto da: (I) nefropatia proteinurica; (II) insufficienza renale cronica; (III) gravi malattie oculari che possono comportare la perdita funzionale e/o richiedano terapie immuno-soppressiva; (IV) gravi malattie articolari che possano invalidare la funzione motoria e/o richiedano terapie immuno-soppressiva.

Tabella 4. Clinical score utilizzati per valutare le variabili a D0, D90 e D180.

SEGNI CLINICI	SCORE			
	0	1	2	3
APPETITO	Normale	Leggermente ridotto	Ridotto notevolmente	Anoressia
APATIA	Assente	Lieve	Grave	Prostrato
POLIDIPSIA	Assente	Assunzione di acqua tra 60-100 ml/kg p.c./die	Assunzione di acqua tra 100-200 ml/kg p.c./die	Assunzione di acqua superiore a 200 ml/kg p.c./die
ATROFIA DEI MUSCOLI TEMPORALI	Assente	Lieve	Grave	Muscoli temporali non visibili
ATROFIA MUSCOLARE GENERALIZZATA	Assente	Lieve	Grave	Cachessia
LINFOADENOMEGALIA	-	1-2 Linfonodi aumentati di volume	Più di 2 aumentati di volume	Linfoadenomegalia generalizzata
SPLENOMEGALIA	-	-	Splenomegalia	-
CONGIUNTIVITE O BLEFARITE	Assente	Lieve Monolaterale	Bilaterale\Grave monolaterale	Grave Bilaterale
CHERATITE\UVEITE	Assente	Lieve Monolaterale	Bilaterale\Grave monolaterale	Grave Bilaterale
MUCOSE OCULOCONGIUTIVALI	Assente	Lievemente pallide	Moderatamente pallide	Porcellanacee
MUCOSA ORALE	Normale	Presenza di 1 o 2 piccole ulcere e\o noduli	Noduli con meno di 1\4 di superficie ulcerata	Noduli con più di 1\4 di superficie ulcerata
MUCOSA NASALE	Normale	-	Epistassi	-
APPARATO GASTRO-ENTERICO	Normale	Vomito\diarrea occasionale	Vomito\diarrea frequente, occasionale presenza di ematochezia	Vomito\diarrea o ematochezia frequente con costante presenza di ematochezia
ARTRITE	Assente	1 sola articolazione interessata	Poliartrite localizzata ad un solo arto	Poliartrite localizzata in più arti
ERITEMA CUTANEO	Assente	Presente in meno del 10% della superficie corporea o eritema cutaneo lieve	Presente in meno del 25% della superficie corporea o eritema cutaneo moderato	Presente in più del 25% della superficie corporea
ULCERE CUTANEE	Assente	Presenza di 1 o 2 ulcere	Presenza di 3-5 ulcere	Presenza di più di 5 ulcere
NODULI CUTANEI	Assente	Presenza di 1 o 2 noduli	Presenza di 3- 5 noduli	Presenza di più di 5 noduli
ALOPECIA +\ -RIDIMENSIONATA \SFOLIAZIONE	Assente	Presente in meno del 10% della superficie corporea o alopecia	Presente in meno del 25% della superficie corporea o alopecia	Presente in più del 25% della superficie corporea

		generalizzata lieve generalizzata	generalizzata moderata	
ONICOGRIFOSI	Assente	Lieve	Moderata	Grave

Tabella 5. Caratteristiche basali dei cani inclusi nello studio, espresse come media +/- deviazione standard.

Variabile	DES	CTR	P-value
Età (mesi)	58,7 +/-29,3	62,6 +/-1,81	0,94
Clinical Score	14,8+/-5,8	11,2+/-5,2	0,82
Temperatura corporea (C°)	39,4+/-0,8	39,6+/-0,81	0,46
Peso (Kg)	18,6+/-10,4	21+/-8,4	0,79
Testosterone ng/ml	3,8 +/- 1,6	4,2+/-2,1	0,89

Grafico 1 - Clinical score medio per ciascun gruppo al giorno 0 (D0), a 90 (D90) e 180 giorni (D180).

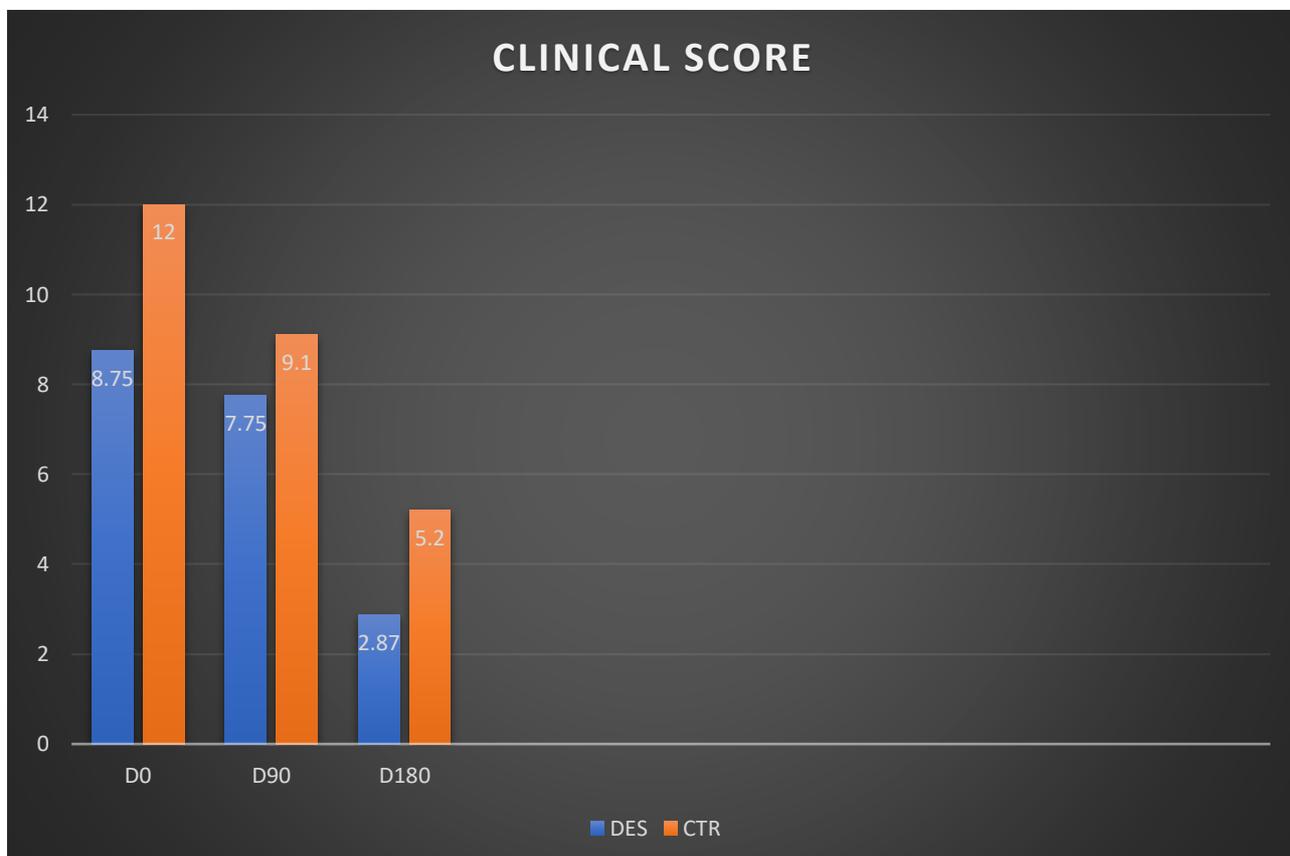
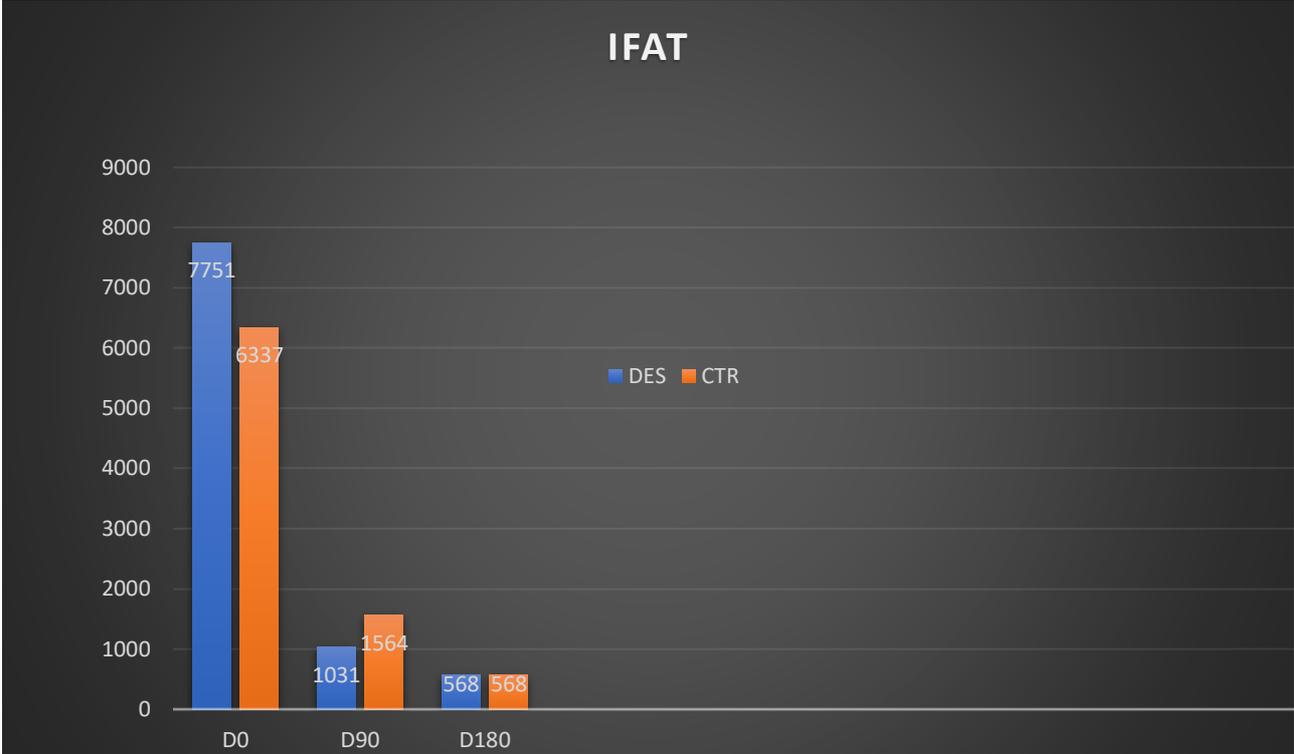


Grafico 2 - Valori medi del titolo anticorpale (IFAT) per ciascun gruppo al giorno 0 (D0), a 90 (D90) e 180 giorni (D180).



BIBLIOGRAFIA

- 1) Aguilar CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi Filho G, De Vargas Z (1989). Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Memorias do Instituto OswaldoCruz*, 84(1): 19-28.
- 2) Alexander J, and Russell D (1992): The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advances in Parasitology*, 31: 175–254.
- 3) Alexander J, Bryson K (2005). T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters*, 99:17–23.
- 4) Alexander J, Satoskar AR, Russell DG (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cellular Sciences*, 112: 2993–3002.
- 5) Alexander, J (1988). Sex differences and cross-immunity in DBA/2 mice infected with *L. mexicana* and *L. major*. *Parasitology*, 96:297–302.
- 6) Alvar J, Canavate C, Molina R, Alexander J, Bryson K (2005). T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters*, 99: 17–23.
- 7) Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M (2012). WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5):e35671.
- 8) Ambrosio JR, Valverde-Islas L, Nava-Castro KE, Palacios-Arreola MI, Ostoa-Saloma P, Reynoso-Ducoing O, Escobedo G, Ruíz-Rosado A, Dominguez-Ramírez L, Morales-Montor J (2015). Androgens Exert a Cysticidal Effect upon *Taenia crassiceps* by Disrupting Flame Cell Morphology and Function. *PLoS One*, 10(6):e0127928.
- 9) Andresen K, Gasin S, El-Hassan A M, Khalil E A, Barkae D C, Thender T G, Kharazmi, A (1997): Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from Sudan. *Tropical Medicine & International Health*, 5: 440–444.
- 10) Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M (2008) Leishmaniasis among organ transplant recipients. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3): 191- 199.
- 11) Anuradha Pal R; Katiyar JC (1990). Sex-influenced population kinetics of *Leishmania donovani* in hamsters. *Indian Journal Experimental Biology*, 28:876–879.
- 12) Ayele A, Seyoum Z (2016). Review on canine leishmaniasis, etiology, clinical sign, pathogenesis, treatment and control methods. *Global Veterinaria*, 17(4): 343- 352.

- 13) Baldelli R, Piva S, Salvatore D, Parigi M, Melloni O, Tamba M, Bellini R & Poglayen G (2011). Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel. *Veterinary Parasitology*, 179: 57-61.
- 14) Baneth G (2014). Tick-borne infections of animals and humans: A common ground. *International Journal for Parasitology*, 44(99): 591-596.
- 15) Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F (2007). Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans: *Advances in Parasitology*, 64:1-109.
- 16) Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Trigo J, Aguiar PHP, Dos-Santos WLC, Pontes-De-Carvalho L (2004) Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(2): 195-197.
- 17) Bates P A (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10): 1097- 1106.
- 18) Beckage NE (1997). Parasites and Pathogens Effects on Host Hormones and Behaviour”, Boston, MA *Springer Science Business Media BV*, 338.
- 19) Bekesi, G, Kakucs, R, Varbiro, S, Racz, K, Sprintz, D, Feher, J, Szekacs, B (2000). In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids*, 65: 889–894.
- 20) Ben Slimane T, Chouih E, Ben Hadj Ahmed S Chelbi I, Barhoumi W, Cherni S, Zoghlami Z, Gharbi M, Zhioua E (2014). An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected dogs and assessment of offspring’s infectiousness potential by xenodiagnoses. *Veterinary Parasitology*, 206(3-4): 282-286.
- 21) Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris CE, Mossman H, Wunderlich F (1999). Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 13:123–133.
- 22) Benten WP, Wunderlich F, Mossman H (1992). *Plasmodium chabaudi*: estradiol suppresses acquiring, but not once acquired immunity. *Experimental Parasitology*, 75:240–247.
- 23) Benten WP, Wunderlich F, Mossman H (1992). Testosterone-induced suppression of self-healing *Plasmodium chabaudi*: and effect not mediated by androgen receptors? *Journal of Endocrinology*, 135:407–413.

- 24) Benten WP, Wunderlich F, Mossman Kuhn-Velten H W N (1993). Testosterone-induced compared with oestradiol-induced immunosuppression against *Plasmodium chabaudi* malaria. *Journal of Endocrinology*, 139:487–494.
- 25) Boehme CC, Hain U, Novosel A, Eichenlaub S, Fleischmann E, Loscher T (2006). Congenital visceral leishmaniasis. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2): 359- 360.
- 26) Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, Petersen CA (2011). Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(4): e1019.
- 27) Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Solari Basano F, Latrofa MS, Tarallo VD, Dantas-Torres F, Capelli G, Stanneck D, Giannetto S, Otranto D (2014). Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 14;7:327.
- 28) Brilhante F, Melchior LAK, Nunes VLB, De Oliveira Cardoso C, Galati EAB (2017). Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in an endemic area of forest extractivist culture in western Brazilian Amazonia *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 59.
- 29) Caldart ET, Freire RL, Ferreira FP, Ruffolo BB, Sbeghen MR, Mareze M, Garcia JL, Mitsuka-Breganó R, Navarro IT (2017). Leishmania in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): New evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 26(1): 17–27.
- 30) Cardo LJ (2006). *Leishmania*: risk to the blood supply. *Transfusion*, 46(9): 1641- 1645.
- 31) Chicharro C, Sirera G, Ares M, Sans A, Videla S, Alvar J (1999). Is *Leishmania infantum* zymodeme MON-253 involved in an outbreak among intravenous drug users? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(4): 385-386.
- 32) Corrales JJ, Almeida M, Miralles JM, Orfao A (2009). Persistence of androgenic effects on the production of proinflammatory cytokines by circulating antigen-presenting cells after withdrawal of testosterone treatment in aging type 2 diabetic men with partial androgen deficiency. *Fertility and Sterility*, 92:311–319.
- 33) Costa CHN (2011) How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 44(2): 232-242.
- 34) Costa JM, Durand R, Deniau M, Rivollet D, Izri M, Houin R, Vidaud M, Bretagne S (1996). PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human

- immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 1831–1833.
- 35) Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Sulli A, Coviello DA, Carabbio C, Felli L, Miceli D, Farruggio R, Carruba G, Castagnetta L (1996). Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81:820–827;
- 36) D'Agostino P, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, Farruggio R, Miceli DM, Miele M, Castagnetta L, Cillari E (1999). Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876:426–429.
- 37) Dahroug MA, Almeida AB, Sousa, VR Dutra V, Guimarães LD, Soares CE, Nakazato L, de Souza RL (2011). The first case report of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in *Panthera leo* in Brazil. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(3): 249-250.
- 38) Dahroug MA, Almeida ABPF, Sousa VRF, Dutra V, Turbino NC, Nakazato L, de Souza RL (2010). *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(1): 73-74.
- 39) Danel L, Souweine G, Monier JC, Saez S (1983). Specific estrogen binding sites in human lymphoid cells and thymic cells. *Journal of Steroid Biochemistry*, 18:559–563
- 40) Dantas-Torres F (2011). Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in Parasitology*, 27(4): 155-159.
- 41) De Almeida Curi NH, Miranda I, Talamoni SA (2006). Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(1): 99-101.
- 42) De Beer PA, el Harith, L, Deng, SJ, Semiao-Santos, B, Chantal, M, van Grootheest (1991). A killing disease epidemic among displaced Sudanese population identified as visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44:283–289;
- 43) De Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dog: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137:159–167.
- 44) De Vasconcelos TCB, Furtado MC, Belo VS, Morgado FN, Figueiredo FB (2019). Canine susceptibility to visceral leishmaniasis: a systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. *Infection, Genetics and Evolution*, 74: 103293.

- 45) Degraive W, Fernandes O, Thiemann O, Wincker P, Britto C, Cardoso A, Pereira JB, Bozza M, Lopes U, Morel C (1994). Detection of Trypanosomacruzi and Leishmania using the polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 367–368.
- 46) Desjeux P (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27: 305–318.
- 47) Di Pietro S, Bosco VRF, Crinò C, Francaviglia F, Giudice E (2016). Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary World*, 9(6): 633-637.
- 48) Di Pietro S, Crinò C, Falcone A, Crupi R, Francaviglia F, Vitale F, Giudice E (2020). Parasitemia and its daily variation in canine leishmaniasis. *Parasitology Research*, 119(10):3541-3548.
- 49) Diener ED., Eunkook S (1997). Measuring quality of life: Economic, social, and subjective indicators. *Social indicators research*, 40: 189-216.
- 50) Dostalova A, Volf P (2012). Leishmania development in sand flies: Parasite vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, 5(1): 276.
- 51) Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbek Y, Boelaert M (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 1013-1018.
- 52) Eguchi GU, Oliveira GG, VJ Babo-Terra, AI Souza, R Barros, MIP Palumbo (2017). Nodular keratoconjunctivitis in a case of canine visceral leishmaniasis: case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69, 6:1480-1484.
- 53) EMA (2008) Suprelorin 4.7mg European Public Assessment Report – Product Information; Annex 1, Summary of Product Characteristics.
- 54) EMA (2010) Summary of Opinion for Suprelorin 9.4mg Implant.
- 55) Escobedo G, Craig WR, Carrero JC, Morales-Montor J (2005). Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitology*, 12:588-593
- 56) Escobedo G, Larralde C, Chavarria A, Cerbón MA, Morales-Montor J (2004). Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. *Journal of Parasitology*, 90(6):1235-44.
- 57) Ferroglio E, Maroli M, Castaldo S, Trisciuglio A, Raimondo C, Veysendaz E, Saracco M, Rossi L (2002). Survey of phlebotomine sandflies in North-West Italy. *Parassitologia*, 44: 68.
- 58) Ferroglio E, Vitale F (2006). Diagnosis of leishmaniasis: between old doubts and new uncertainties. *Veterinary Research Communication*, 30: 35-38.

- 59) Figueiredo FB, Gremiao IDF, Pereira SA, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar DA, Schubach TM, Madeira MF (2008). First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2): 200-201.
- 60) Flegr J, Lindová J, Kodým P (2008). Sex-dependent toxoplasmosis-associated differences in testosterone concentration in humans. *Parasitology*, 135(4):427-31.
- 61) Foglia Manzillo V, Gizzarelli M, Vitale F, Montagnaro S, Torina A, Sotera S, Oliva G (2018). Serological and entomological survey of canine leishmaniasis in Lampedusa island, Italy. *BMC Veterinary Research* 19;14(1):286.
- 62) Font A, Mascort J, Altimira J, Closa JM, Vilafranca M (2004). Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, 45 (4),199-201.
- 63) Foo, YZ, Nakagawa, S, Rhodes, G, Simmons, LW (2017). The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 92(1):551-571.
- 64) Fox HS, Bond BL, Parslow TG (1991). Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *Journal of Immunology*, 146:4362–4367.
- 65) Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujiardin JC, Van der Auwera G (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein70 gene *Infection, Genetics and Evolution*, 10: 238-245.
- 66) Garcia N, Moreno I, Alvarez J, de la Cruz ML, Navarro A, Pérez-Sancho M, García-Seco T, Rodríguez-Bertos A, Conty ML, Toraño A, Prieto A, Domínguez L, Domínguez M (2014). Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain. *BioMed Research International*, 318254.
- 67) Ghansah TJ, Ager EC, Freeman-Junior P, Villalta F, Lima MF (2002). Epidermal growth factor binds to a receptor on *Trypanosoma cruzi* amastigotes inducing signal transduction events and cell proliferation. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49:383-390.
- 68) Gharbi M, Mhadhbi M, Rejeb A, Jaouadi K, Rouatbi M, Darghouth MA(2015). Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 34(2): 613-626.
- 69) Giger U, Oakley DA, Owens SD, Schantz P (2002). *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion*, 42:381–383.
- 70) Giudice E, Passantino A (2011). Detection of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood from four dogs short communication. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59:205–213.

- 71) Goericke Pesch S (2017). Long-term effects of GnRH agonists on fertility and behaviour. *Reproduction in Domestic Animals*, 52:336–47.
- 72) Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Veterinary Journal*, 175: 45-52.
- 73) Gradoni L, Pizzuti R, Scalone A, Russo M, Gramiccia M, di Martino L, Pempinello R, Gaeta GB(1996) Recrudescence of visceral leishmaniasis unrelated to HIV infection in the Campania. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(3):234-235.
- 74) Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson AD (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infectious Diseases*, 2(8):494-501.
- 75) Hasselquist, D (2007). Comparative immunoeology in birds: hypotheses and tests. *Journal of Ornithology*, 148:S571–S582.
- 76) Hepworth, MR., Hardman, MJ., Grecis, RK (2010). The role of sex hormones in the development of Th2 immunity in a gender-biased model of *Trichuris muris* infection. *European Journal of Immunology*, 40:406–416.
- 77) Holzmuller P, Cavaleyra M, Moreaux J, Kovacic R, Vincendeau P, Papierok G, Lemesre JL (2005). Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted- secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106: 247-257.
- 78) Hosein S, Blake DP, Solano-Gallego L (2017). Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology*, 144(1): 95-115.
- 79) Hou J, Zheng WF(1988). Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice. *International Journal of Immunopharmacology*, 10:15–22.
- 80) Jahn A, Lelmet JM, Diesfeld HJ (1996). Seroepidemiological study on kala-azar in Baringo District, Kenya. *The Journal of tropical medicine and hygiene*, 89:91–96.
- 81) Johannsen TH, Main KM, Ljubicetal ML (2018). Sex differences in reproductive hormones during mini-puberty in infants with normal and disordered sex development. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 103: 3028–3037.
- 82) Jones LA, Anthony JP, Henrique FL, Lyons RE, Nickdel MB, Carter KC, Alexander J, Roberts CW (2008). Toll-like receptor-4-mediated macrophage activation is differentially regulated by progesterone via the glucocorticoid and progesterone receptors. *Immunology*, 125:59–69.

- 83) Junaidi A, Williamson PE, Cummins JM, Martin GB, Blackberry MA, Trigg TE (2003). Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reproduction, Fertility and Development*, 15:317–22.
- 84) Junaidi A, Williamson PE, Martin GB, Blackberry MA, Cummins JM, Trigg TE (2009). Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, Deslorelin. *Reproduction in Domestic Animals*, 44:725–34.
- 85) Junaidi A, Williamson PE, Trigg TE, Cummins JM, Martin GB (2009). Morphological study of the effects of the GnRH superagonist deslorelin on the canine testis and prostate gland. *Reproduction in Domestic Animals*, 44:757–63.
- 86) Kanda N, Tamaki K (1999). Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103, 282–288.
- 87) Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K (1996). Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 106: 410–415.
- 88) Karkamo V, Kaistinen A, Nareaho A, Dillard K, Vainio-Siukola K, Vidgrén G, Tuoresmäki N, Anttila M (2014). The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56: 84, 2014.
- 89) Kaszak I, Planellas M, Dworecka-Kaszak B (2015). Canine leishmaniosis-an emerging disease. *Annals of Parasitology*, 61(2): 69-76.
- 90) Kaye P, Scott P (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Natural Review Microbiology*, 9(8):604-615.
- 91) Kobets T, Havelková H, Grekov I, Volkova V, Vojtíšková J, Slapničková M, Kurey I, Sohrabi Y, Svobodová M, Demant P, Lipoldová M (2012). Genetics of host response to *Leishmania tropica* in mice - different control of skin pathology, chemokine reaction, and invasion into spleen and liver. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6):e1667.
- 92) Koutinas AF, Koutinas CK (2014). Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*, 51(2): 527-538.
- 93) Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Passam FH, Kourelis TV, Foundouli P, Matalliotakis E, Maniatis AN (2003). Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood by flow cytometry. Is prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? *Transfusion Medicine*. 13:59–62.

- 94) Lainson R (2010). The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan- Amazonica de Saude*, 1(2): 13-32.
- 95) Lainson R, Braga RR, De Souza AA, Pova MM, Ishikawa EA, Silveira FT (1989). *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*. 64(3): 200-207.
- 96) Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, 11(5):210-214.
- 97) Lezama-Davila CM, Oghumu S, Satoskar AR, Isaac-Marquez AP (2007) "Sex-associated susceptibility in humans with chiclero's ulcer: resistance in females is associated with increased serum-levels of GM-CSF," *Scandinavian Journal of Immunology*, 65: 210-211.
- 98) Li Q, Verma IM (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2:725-734.
- 99) Lima WG, Michalick MSM, Melo MND, Tafuri WL (2004). Canine visceral leishmaniasis: A histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*, 92(1): 43-53.
- 100) Lin AA, Wojciechowski SE, Hildeman DA (2010). Androgens suppress antigen-specific T cell responses and IFN- γ production during intracranial LCMV infection. *Journal of Neuroimmunology*, 226, 8-19.
- 101) Lockard Ryan D, Wilson Mary E, Rodríguez Nilda E (2019). Sex-Related Differences in Immune Response and Symptomatic Manifestations to Infection with *Leishmania* Species. *Journal of Immunology Research*, 10:4103819
- 102) Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J (1993). Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49 (3): 348-359.
- 103) Ludwig C, Desmoulins PO, Driancourt MA, Goericke-Pesch S, Hoffmann B (2009). Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-agonist azagly-nafarelin as a removable implant Gonazon: a preclinical trial. *Theriogenology*, 71:1037-1045.
- 104) Maia C, Campino L (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, 27(8): 341-344.
- 105) Malta MCC, Tinoco HP, Xavier MN, Vieira ALS, Costa EA, Santos RL (2010). Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 169(1-2): 193-197.

- 106) Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S (1988). Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4): 566-567.
- 107) Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P, Gravino AE (2015). Longterm follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites & Vectors*, 8(1): 289.
- 108) Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F, Guery JC (2003). Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *European Journal of Immunology*, 33:512–521.
- 109) Maroli M, Ascione R, Gradoni L, Gramiccia M, Bigliocchi F, Khoury C (1994). Indagine sui vettori della leishmaniosi in tre focolai della Campania. *Parassitologia*, 36: 89.
- 110) Maroli M, Bigliocchi F, Khoury C (1994). I flebotomi in Italia: osservazioni sulla distribuzione e metodi di cattura. *Parassitologia*, 36: 251-264.
- 111) Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medicine and Veterinary Entomology*, 27(2):123-147.
- 112) Maroli M, Khoury C, Bianchi R, Ferroglio E, Natale A (2002). Recent findings of *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 in Italy and its western limit of distribution. *Parassitologia*, 44: 103-109.
- 113) Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 145(3-4): 357-360.
- 114) Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, Paltrinieri S, Roura X, Zini E, Zatelli A (2010). Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 236: 1200-1206.
- 115) Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine and International Health* 13: 256-264.

- 116) Márquez M, Pedregosa JR, López J, Marco-Salazar P, Fondevila D, Pumarola M (2013). *Leishmania amastigotes* in the central nervous system of a naturally infected dog. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 25,142-146.
- 117) Masucci M, De Majo M, Contarino RB, Borruto G, Vitale F, Pennisi MG (2003). Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Veterinary Research Communications*, 27(1): 771-774.
- 118) McConkey SE, López A, Shaw D, Calder J. Leishmanial polyarthritis in a dog. *Canine Veterinary Journal*, 43(8):607-609.
- 119) Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B (1999) .Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics*, 104(5): e65.
- 120) Mellor AL, Munn DH (2000). Immunology at the maternalfetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annual Review of Immunology*, 18: 367–391.
- 121) Miller L, Hunt JS (1996). Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Science*, 59:1–14.
- 122) Millott JL (1994). Olfactory and visual cues in the interaction systems between dogs and children. *Behaviour Procedures*, 33, 177-188.
- 123) Mills SC, Grapputo A, Jokinen I, Koskela E, Mappes T, Oksanen TA, Poikonen, T (2009). Testosterone-mediated effects on fitness-related phenotypic traits and fitness. *American Naturalist*, 173:475–487.
- 124) Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24(8): 371-377.
- 125) Mock BA, Nacy CA (1988). Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. *Infectious and Immunity*, 56: 3316–3319.
- 126) Molina R, Jimenez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 190(1-2): 268-271.
- 127) Moll H., Fuchs H., Blank C., Rollinghoff M (1993). Langerhans cells transport *Leishmania major* from infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *European Journal Immunology*, 23:1595–1601.
- 128) Moreno J, Nieto J (2004) Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57: 1-88.

- 129) Morillas-Marquez F, Martin-Sanchez J, Acedo-Sanchez C, Pineda JA, Macias J, Sanjuan-Garcia J (2002). *Leishmania infantum* (Protozoa, Kinetoplastida): Transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. *Experimental Parasitology*, 100(1): 71-74.
- 130) Munoz G, Davies CR (2006). *Leishmania panamensis* transmission in the domestic environment: the results of a prospective epidemiological survey in Santander, Columbia. *Biomedica*, 26:131–144.
- 131) Naucke TJ, Amelung S, Lorentz S (2016). First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasites & Vectors*, 9(1): 256.
- 132) Nava-Castro K, Hernandez-Bello R, Muñiz-Hernandez S (2012). Sex steroids, immune system, and parasitic infections: facts and hypotheses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1262:6-26.
- 133) Navarro C, Schober PA (2012). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of a sustained-release implant of deslorelin in companion animals. In: 7th ISCF, Whistler, BC, 177–179.
- 134) Nicolle C, Comte C (1908). Origine canine du Kala-azar. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 1: 299-301.
- 135) Nilsson N, Carlsten H (1994). Estrogen induces suppression of natural killer cell cytotoxicity and augmentation of polyclonal B cell activation. *Cellular Immunology*, 158:131–139.
- 136) O’Shea JJ, Ma A, Lipsky P (2002). Cytokines and autoimmunity. *Natural Reviews Immunology*, 2:37–45.
- 137) Oliva G, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 236:1192.
- 138) Oliva G, Roura X, Crotti A, Zini E, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A (2008). Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte II: Approccio terapeutico. *Veterinaria*, 22: 9-20.
- 139) Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NCM, Schoone GJ, Khalil EAG, El-Hassan AM, Kager PA (1997). Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal Clinical Microbiology*, 35, 2454–2457.

- 140) Otero AC, da Silva VO, Luz KG, Palatnik M, Pirmez C, Fernandes O, Palatnik de Sousa CB (2000). Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62:128–131.
- 141) Otranto D, Dantas-Torres F (2005). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Emerging Infectious Disease*, 11(10):1618-1620.
- 142) Otranto D, Paradies P, de Caprariis D, Stanneck D, Testini G, Grimm F, Deplazes P, Capelli G (2009). Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(3):337-343.
- 143) Otranto D, de Caprariis D, Lia RP, Tarallo V, Lorusso V, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa S, Diniz PP, Mencke N, Maggi RG, Breitschwerdt E, Capelli G, Stanneck D (2010). Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: A longitudinal field study. *Veterinary Parasitology*, 172(3-4): 323-332.
- 144) Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal American Veterinary Medical Association*, 15:1076–1083.
- 145) Padula AM (2005). GnRH analogues- agonists and antagonists. *Animal Reproduction Science*, 88:115–26.
- 146) Pagliano P, Carannante N, Rossi M, Gramiccia M, Gradoni L, Faella FS, Gaeta GB (2005). Visceral leishmaniasis in pregnancy: A case series and a systematic review of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(2): 229-233.
- 147) Pagliano P., Rossi M., Rescigno C, Altieri S, Coppola MG, Gramiccia M, Scalone A, Gradoni L, Faella F (2003). Mediterranean visceral leishmaniasis in HIV-negative adults: a retrospective analysis of 64 consecutive cases (1995–2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 264–268.
- 148) Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11): 1184-1191.
- 149) Peña MT, Roura X, Davidson MG (2000). Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*, 3(1):35-41.

- 150) Peña, MT, Naranjo C, Klauss G, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Davidson MG, Dubielzig RR (2008). Histopathological features of ocular leishmaniasis in the dog. *Journal of Comparative Pathology*, 138: 32-39.
- 151) Pennisi M.G., Persichetti F (2018). Feline leishmaniosis: is the cat a small dog? *Veterinary Parasitology*, 251: 131-137.
- 152) Petersen CA, Barr SC (2009). Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Veterinary Clinical North American Small Animal Practice*, 39(6):1065-1074.
- 153) Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognar S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, Romagnani S, Maggi E (1995). Progesterone favors the development of human Thelper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane expression in established Th1 cell clones. *Journal of Immunology*, 155:128–133.
- 154) Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S (2000). Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *Journal of Neuroimmunology*, 109:30–33.
- 155) Poglayen G, Marangon S, Manca MG, Capelli G, Dalla Pozza M, Casati D, Vantini E, Bressan G, Passarini G (1997). A new outbreak of canine leishmaniosis in the North-East of Italy. *Acta Parasitologica Turcica*, 21: 143.
- 156) Posma E, Moes H, Heineman MJ, Faas MM (2004). The effect of testosterone on cytokine production in the specific and non-specific immune response. *American Journal of Reproduction and Immunology*, 52:237–243.
- 157) Pozio E, Gradoni L, Gramiccia M (1985). Canine leishmaniasis in Italy from 1910 to 1983. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 60: 543-553.
- 158) Quinnell RJ, Courtenay O (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136: 1915-1934.
- 159) Ready PD (2008). Leishmaniasis emergence and climate change. In: de La Roque S. Climate change: the impact on the epidemiology and control of animal diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 27(2): 399-412.
- 160) Remoué F, Mani JC, Pugnière M, Schacht AM, Capron A, Riveau G (2002). Functional specific binding of testosterone to *Schistosoma haematobium* 28-Kilodalton glutathione S-transferase. *Infectious and Immunology*, 70:601-615.

- 161) Ribeiro RR, Silva SM, Fulgencio GD, Michalick MS, Frezard FJ (2013). Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 22(3): 373-378.
- 162) Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jiménez M, Muncunill J, Sedeño M, Mascaró M, Udina M, Gállego M, Carrió J, Forteza A, Portús M (2008). Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion*, 48:1383–1389.
- 163) Riera C, Valladares JE (1996). Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitology Today*, 12(10): 412.
- 164) Roberts CW, Satoskar A, Alexander J (1996). Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitology Today*, 12:382–388.
- 165) Roberts CW, Walker W, Alexander J (2001). Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical Microbiology Review*, 476-488.
- 166) Roberts ML, Buchanan KL, Evans MR (2004). Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Animal Behaviour*, 68:227–239.
- 167) Roden AC, Moser MT, Tri SD, Mercader M, Kuntz SM, Dong H, Hurwitz AA, David J, McKean DJ, Celis E, Leibovich BC, Allison JP, Kwon ED (2004). Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *Journal of Immunology*, 173, 6098–6108.
- 168) Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 71, 267–275.
- 169) Rolff J (2002). Bateman's principle and immunity. *Proceedings of Royal Society B Biological Sciences*, 269:867–872.
- 170) Roque ALR, Jansen AM (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Parasites and Wildlife*, 3(3): 251-262.
- 171) Rossi L, Ferroglio E, Guiso P, Ferrasi P, Pancaldi P (1999). Segnalazione di un focolaio di leishmaniosi canina sulla collina torinese. *Medicina Veterinaria Preventiva*, 20: 20.
- 172) Rosypal AC, Lindsay DS (2005). Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. *Journal of Parasitology*, 91(5): 1113-1115.
- 173) Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS (2005). Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology*, 91(4): 970-972.

- 174) Roura X, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Maroli M, Oliva G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E (2013). Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *Veterinary Journal*, 198(1): 43-47.
- 175) Roura X, Fondevilla D, Sanchez A, Ferrer L (2014). Detection of *Leishmania* infection in paraffin embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 385-387.
- 176) Rowan AN, Beck AM (1994). The health benefits of human-animal interactions". *Anthrozoös*, 7(2), 85-89.
- 177) Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M, Ferrer L (2014). A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive Veterinary Medicine*, 115(1-2): 56-63.
- 178) Saliba EK, Oumeish OY (1999). Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, 17(3): 275-277.
- 179) Santos M, Marcos R, Assunção M, Matos AJ (2006). Polyarthrititis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Veterinary Parasitology*, 5(3-4):340-344.
- 180) Satoskar A, Al-Quassi HH, Alexander J (1998). Sex-determined resistance against *Leishmania mexicana* is associated with the preferential induction of a Th1-like response and IFN-gamma production by female but not male DBA/2 mice. *Immunology and Cellular Biology*, 76:159–166.
- 181) Satoskar A, Alexander J (1995). Sex-determined susceptibility and differential IFN-gamma and TNF-alpha mRNA expression in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Immunology*, 84:1–4.
- 182) Sbrana S, Marchetti V, Mancianti F, Guidi G, Bennett D (2014). Retrospective study of 14 cases of canine arthritis secondary to *Leishmania* infection. *Journal of Small Animal Practice*, 55(6):309-313.
- 183) Schneider M (1979). The quality of life and social indicators research. *Public Administration Review* 36, 297–305.
- 184) Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160(1-2): 55-59.
- 185) Silva RC, Richini-Pereira VB, Kikuti M, Marson PM, Langoni H (2017). Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. *Veterinary Quarterly*, 37(1): 23-30.

- 186) Sinder H, Lezama-Davila C, Alexander J, Satoskar AR (2009) Sex hormones and modulation of immunity against Leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation*, 16(2):106-113.
- 187) Smyth AJS, Ghosh A, Hasan MQ, Basu D, de Bruijn MHL, Adhya S, Mallik KK, Barker DC (1992). Rapid and sensitive detection of Leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, 105, 183–192.
- 188) Snider H, Lezama-Davila C, Alexander J, Abhay R (2009). Satoskar Sex Hormones and Modulation of Immunity against Leishmaniasis *Neuroimmunomodulation*, 16(2): 106–113.
- 189) Soares IR, Silva SO, Moreira FM, Gavião Prado L, Fantini Priscila P, de Pino Albuquerque Maranhão R, Monteiro da Silva Filho J, Melo MN, Palhares MS (2013). First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology* 197(3-4): 665-669.
- 190) Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165: 1-18.
- 191) Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasite & Vectors*, 4: 86.
- 192) Solano-Gallego L, Morel P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 560-563.
- 193) Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, Portús M, Finestres Alberola J (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(4): 676-680.
- 194) Souza NP, Almeida Ado B, Freitas TP, Paz RC, Dutra V, Nakazato L, Sousa VR (2010). *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 3(3): 333-335.
- 195) Sundar S, Rai M (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5): 951-958.

- 196) Sundar S, Rai M (2020). Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, doi: 10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002.
- 197) Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L, Ruiz de Gopegui R (2008). Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *Journal of Small Animal Practice*, 49:325–328.
- 198) Toder V, Nebel L, Elrad H, Blank M, Durdana A, Gleicher N (1984). Studies of natural killer cells in pregnancy. 2. The immunoregulatory effect of pregnancy substances. *Journal of Clinical Laboratory and Immunology*, 14:29–133.
- 199) Topal J, Miklosi A, Csanyi V, Doka A (1998). Attachment behavior in dogs (*Canis familiaris*): A new application of Ainsworth's (1969) strange situation test. *Journal of Comparative Psychology*, 112(3), 219-229.
- 200) Torres M, Pastor J, Roura X, Tabar MD, Espada Y, Font A, Balasch J, Planellas M (2016). Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, 57(6): 299-304.
- 201) Trigg TE, Doyle AG, Walsh JD, Swangchan-Uthai T (2006). A review of the advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*, 66:1507–1512.
- 202) Trigunaite A, Dimo J, Jørgensen TN (2015). Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cellular Immunology*, 294:87–94.
- 203) Tsakmakidis I, Angelopoulou K, Dovas CI, Dokianakis E, Tamvakis A, Symeonidou I, Antoniou M, Diakou A (2017). *Leishmania* infection in rodents in Greece. *Tropical Medicine & International Health*, 22 (12): 1523-1532.
- 204) Tsokana CN, Sokos C, Giannakopoulos A, Mamuris Z, Birtsas P, Papaspyropoulos K, Valiakos G, Spyrou V, Lefkaditis M, Chatzopoulos DC, Kantere M, Manolakou K, Touloudi A, Burriel AR, Ferroglio E, Hadjichristodoulou C, Billinis C (2016). First evidence of *Leishmania* infection in European brown hare (*Lepus europaeus*) in Greece: GIS analysis and phylogenetic position within the *Leishmania* spp. *Parasitology Research*. 115(1): 31321.
- 205) Turchetti AP, Souza TD, Paixao TA, Santos RL (2014). Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(4): 403-407.
- 206) Turetz, Meredith L., Paulo R. Machado, Albert I. Ko, Fábio Alves, Achiléa Bittencourt, Roque P. Almeida, Niloufar Mobashery, Warren D. Johnson, Jr., Edgar M

- (2002). Carvalho "Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 12, 1829–1834.
- 207) Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of Immunology*; 173: 6521–6525.
- 208) Viñuelas J, García-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Mirón C, Carcelén J, Alonso C, Nieto CG (2001). Meningeal leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 101(1), 23-27.
- 209) Wegman TG, Lin H, Guibert L, Mosmann TL (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH-2 phenomenon? *Immunology Today*, 14, 353–356.
- 210) Wunderlich F, Benten WP, Lieberherr M, Guo Z, Stamm O, Wrehlke C, Sekeris CE, Mossman H (2002). Testosterone signaling in T cells and macrophages. *Steroids*, 67:535–538.
- 211) Wylie CE, Carbonell-Antoñanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, Solano-Gallego L. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniasis, part I: vaccinations. *Preventive Veterinary Medicine*, 117: 7-18.
- 212) Yao GH, Liang J, Han XD, Hou YY (2003). Vivo modulation of the circulating lymphocyte subsets and monocytes by androgen. *International Immunopharmacology*, 3:1853–1860.
- 213) Zaffaroni EL, Rubaudo P, Lanfranchi W, Mignone T (1999). Epidemiological patterns of canine leishmaniasis in Western Liguria (Italy). *Veterinary Parasitology*, 81:11–19.
- 214) Zinchuk A, Nadraga A (2010). Congenital visceral leishmaniasis in Ukraine: Case report. *Annals of Tropical Paediatrics*, 30(2): 161-164.
- 215) Zobba R, Evangelisti MA, Manunta ML, Alberto A, Deborah Z, Pinna Parpaglia ML (2017). A case of canine neurological leishmaniasis *Veterinaria Italiana*, 53 (4), 321-326.
- 216) Zuckerman SH, Bryan-Poole N, Evans GF, Short L, Glasebrook AL (1995). In vivo modulation of murine serum tumour necrosis factor and interleukin-6 levels during endotoxemia by oestrogen agonists and antagonists. *Immunology*, 86:18–24.
- 217) Zuk M (1990). Reproductive strategies and disease susceptibility - an evolutionary view- point. *Parasitology Today*, 6:231–233.

218) Zuk M, McKean KA (1996). Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *International Journal Parasitology*, 26:1009–1023.

SITOGRAFIA

- www.salute.gov.it
- https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/suprelorin-epar-product-information_en.pdf(accessed December 12, 2019).
- <http://iris-kidney.com>
- WHO (2012). Disease Watch Focus: Leishmaniasis. http://www.who.int/tdr/publications/disease_watch/leish/en/index.html.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Annamaria Passantino, per la quale nutro profonda stima e fiducia , per avermi sostenuto , per avermi dato preziosi consigli nei momenti di sconforto e nelle difficoltà quotidiane che si sono presentate durante questo bellissimo ma impegnativo percorso, per avermi dato l’opportunità di intraprendere un percorso formativo all’estero, con la speranza che la nostra amicizia e collaborazione lavorativa possa continuare in futuro.

Ringrazio la Prof.ssa Michela Pugliese sempre affettuosa e disponibile nell’affiancarmi nella realizzazione del progetto di ricerca e nella stesura della Tesi.

Ringrazio il Professore Marco Quartuccio per avermi supportato nel mio percorso universitario e per essere stato per me un grande amico anche al di fuori dell’ambito lavorativo.

Ringrazio il Dott. Mangiala Lorenzo, informatore scientifico tecnico della casa farmaceutica Virbac per avermi fornito una parte degli impianti utili per la realizzazione del progetto.

Ringrazio la mia famiglia per avermi sempre sostenuto, ma un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Annastella Falcone che mi ha sempre incoraggiato in questi anni condividendo con me questo splendido percorso.