

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA
SICILIA “A. MIRRI”**



“RICERCA CORRENTE IZS SI 05/16”

Responsabile Scientifico: Dott. Fabrizio Vitale

*“Stilbene ST18, terfenile TR4 e carrier innovativi: effetti in cellule di *Leishmania spp.* ed in modelli sperimentali *in vivo*”.*

Abstract

Questo abstract fa riferimento alla Ricerca Corrente IZS SI 05/16 e vede la collaborazione di sei UU.OO.:

- n. identif. U.O.:1..IMS.... Responsabile U.O.: Dott. Fabrizio Vitale - C.Re.Na.L.- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia.
- n. identif. U.O.:2..IMS.... Responsabile U.O.: Dott. Giovanni Cassata– Stabulario –Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia.
- n. identif. U.O.:1..EMS.... Responsabile U.O.: Dott. Manlio Tolomeo– Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute, Sezione di Malattie Infettive, Università di Palermo.
- n. identif. U.O.:2..EMS.... Responsabile U.O.: Prof.ssa Marinella Roberti – Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna.
- n. identif. U.O.:3..EMS.... Responsabile U.O.: Prof. Domenico Britti– Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi "Magna Graecia" di Catanzaro.
- n. identif. U.O.:4..EMS.... Responsabile U.O.: Dott.ssa Donatella Paolino – Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi "Magna Graecia" di Catanzaro

Introduzione:

La leishmaniosi è una malattia protozoaria dalla patogenesi complessa, trasmessa attraverso la puntura di insetti flebotomi e responsabile di differenti manifestazioni cliniche sia nel cane che nell'uomo. I farmaci più comunemente studiati per il trattamento della leishmaniosi sono i composti dell'antimonio, l'allopurinolo, le aminosidine, l'amfotericina B, il miltefosine, il pentamidine, la spiramicina in combinazione col metronidazolo, la marbofloxacin, l'enrofloxacin e il domperidone. Gli obiettivi del trattamento anti-*Leishmania*, sono rivolti ad una riduzione generalizzata del carico dei parassiti, nonché trattare il danno tissutale causato dal protozoo nei diversi organi, ristabilire una risposta immunitaria efficiente, mantenere un miglioramento della condizione clinica e trattare le eventuali ricadute. Nessuno dei farmaci, in uso a oggi, si è dimostrato in grado di eliminare l'infezione, determinando uno stato di remissione dei sintomi, ne temporanea ne permanente. Negli ultimi anni, è emerso un crescente interesse nello studio di alcuni composti organici appartenenti alla famiglia degli stilbeni e dei terfenili. Diversi stilbeni naturali, come il resveratrolo, o di nuova sintesi, come il TTAS, possono interferire sul ciclo cellulare dei parassiti, bloccando la loro attività replicativa. Nell'ambito dei derivati di sintesi del resveratrolo si è osservato che tali composti, contenenti gruppi ossidrilici, sono dotati di un effetto antiossidante, antiproliferativo e proapoptotico sia su cellule neoplastiche che in colture di *Leishmania*. I composti terfenilici, mostrano un'efficace attività farmacologica come immunosoppressori, neuroprotettori, anti-trombinici, anticoagulanti, inibitori enzimatici specifici e agenti citotossici. Nella ricerca corrente IZS SI 08/12 si è evidenziato che lo stilbene ST18 e il terfenile TR4 presentano un interessante effetto anti *Leishmania* e una bassa citotossicità in colture macrofagiche, azione che potrà essere potenziata incapsulando l'ST18 e TR4 in nanoparticelle innovative, *carrier* oggetto di studio nella RC IZS SI 09/11.

Obiettivi: Con il presente lavoro ci si propone di identificare nuove molecole con azione citotossica, non solo per il parassita *Leishmania infantum*, endemico nel nostro

territorio, ma comprendere l'azione leishmanicida dell'ST18 e del TR4 in differenti specie *Leishmania*, quali *L. major*, *L. amazoniensis*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, e *L. tropica*. Il progetto si prefigge inoltre, di comprendere i profili citochinici sviluppati da macrofagi infetti con il parassita in modelli cellulari *in vitro*, dopo trattamento con ST18 e TR4, al fine di comprendere il potenziale effetto immunomodulante. Infine, lo studio avrà l'obiettivo di valutare la tossicità dei composti in modelli sperimentali *in vivo* e l'eventuale riduzione della carica parassitaria, al fine di identificare nuovi composti con un potere leishmanicida, che possano essere arruolati nell'approccio terapeutico della leishmaniosi.

Risultati:

Nel presente studio abbiamo osservato che TR4 era molto attivo in tutte le specie di *Leishmania* trattate, mostrando un'attività leishmanicida superiore a quella di ST18 e antimonio di meglumina, farmaco di riferimento per le Leishmaniosi, nella maggior parte delle specie. Mediante analisi citofluorimetrica e saggi dell'Annexina V si è proceduto a comprendere i meccanismi di morte cellulare indotta da tali composti nel parassita *Leishmania*: il trattamento del parassita con 10 mg/mL con St18 e Tr4 per 48 h induce l'esternalizzazione del PS indicando che la possibile causa di morte del parassita è per attivazione apoptotica. Inoltre, TR4 è stato in grado di diminuire i livelli di IL-10, una citochina in grado di rendere inattivo il macrofago ospite permettendo la persistenza dei parassiti all'interno del suo fagolisosoma, e aumentare i livelli di IL-1 β , una citochina importante per la resistenza dell'ospite all'infezione da *Leishmania* dalla produzione inducibile di NO mediata da iNOS e IL-18, una citochina implicata nello sviluppo della risposta immunitaria di tipo Th1.

La sperimentazione *in vivo* in modelli murini BALB-C, dopo tre somministrazioni di 1×10^7 *L. infantum*/mL (tempo inoculo 0, 7 giorni e 14 giorni) per via intraperitoneale, ha confermato come il modello murino Balb/C non sia il modello sperimentale adeguato per simulare una Leishmaniosi da infezione di *L. infantum*, in quanto in tutte

le matrici analizzate mediante Real Time PCR si è dimostrata un'assenza della carica parassitaria.

In questo studio preliminare, inoltre, è stato valutato l'effetto tossico acuto dei due nuovi composti, in seguito a singola somministrazione a concentrazione crescente in modelli murini non infetti da *Leishmania*. Dall'analisi istologica degli organi murini si è osservata una sofferenza a livello renale ed epatico. Per il rene sono stati quantificati i tubuli necrotici, e il numero di cellule glomerulari. I dati evidenziano un aumentare della tossicità all'aumentare della concentrazione per quanto riguarda il TR4, nel caso del composto ST18 invece emerge differenza tra 50 e 100 mg/ml (considerando che la quantificazione però è riferita ad un solo animale e quindi statisticamente non significativa). Nel secondo campionamento invece un grosso peso ha il solvente, DMSO, con un valore di necrosi prossimo a quello dei composti utilizzati.

Conclusioni: In conclusione con il presente progetto abbiamo dimostrato che lo stilbene St18 e il terfenile TR4 presentano una interessante azione citotossica nei confronti di tutte le specie di *Leishmania*, determinando una morte apoptotica dei parassiti. Inoltre i composti hanno dimostrato come siano in grado di modulare i livelli di citochine coinvolte nella regolazione del sistema immunitario contro la *Leishmania*. Infine, i dati ottenuti nei saggi *in vivo* confermano come il modello murino BALB-C non è da considerarsi un ottimo modello sperimentale, per le infezioni da *L. infantum*, in quanto sviluppa una risposta TH1 che determina una risoluzione spontanea della patologia. Alla luce dei risultati ottenuti l'azione citotossica e leishmanicida dei composti oggetto di studio sarà quindi valutata in modelli sperimentali diversi dal modello murino Balb/C. E' stata richiesta l'autorizzazione, subito approvata dal ministero (n 679/2018-PR prot. 28875.26), a continuare questa sperimentazione in un altro modello sperimentale: il criceto (*Mesocricetus auratus*). Inoltre si procederà ad utilizzare un solvente differenze al DMSO per solubilizzare ST18 e TR4 che non mostri tossicità negli organi dei modelli sperimentali.

Bibliografia

- RC IZS SI 09/11 “Studio *in vitro* e applicazione di carrier innovativi da impiegare in protocolli terapeutici in cani affetti da *Leishmania infantum*”
- RC IZS SI 08/12 Nuovi approcci terapeutici per la terapia della infezione da *Leishmania infantum*: il ruolo di composti naturali, stilbenici, terfenilici e valutazioni *in vitro* e *in vivo*”.
- Tolomeo M, Roberti M, Scapozza L, Tarantelli C, Giacomini E, Titone L, Saporito L, Di Carlo P, Colomba C. TTAS a new stilbene derivative that induces apoptosis in *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol.* 2013 Jan;133(1):37-43.
- Castelli G, Bruno F, Vitale F, Roberti M, Colomba C, Giacomini E, Guidotti L, Cascio A, Tolomeo M. *In vitro* antileishmanial activity of trans-stilbene and terphenyl compounds. *Exp Parasitol.* 2016 Jul;166:1-9.
- Herwaldt BL, 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191–1199.
- Cupolillo E, Medina-Costa E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr, 2000. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today* 16: 142–144.
- Berman JD, 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and therapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 24: 684–703.
- Maia, C., Rol-ao, N., Nunes, M., Gonçalves, L., Campino, L., 2007. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Trop.* 103, 150e155.
- Savoia, D., 2015. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.* 9, 588e596.
- Roberti, M., Pizzirani, D., Recanatini, M., Simoni, D., Grimaudo, S., Di Cristina, A., Abbadessa, A., Gebbia, N., Tolomeo, M., 2006. Identification of a terphenyl derivative that blocks the cell cycle in the G0G1 phase and induces differentiation in leukemia cells. *J. Med. Chem.* 49, 3012e3018.