



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO



Giornata di Studio sulla Brucellosi Teramo, 17 giugno 2021

Infezione da *Brucella ceti* nei Cetacei: Indagini siero-epidemiologiche e neuropatogenetiche, con particolare riferimento al sistema endocannabinoide di *Stenella coeruleoalba*

Clotilde B. Angelucci¹, Roberto Giacomini-Stuffler¹, Sergio Oddi¹, Marina Baffoni¹, Cristina Esmeralda Di Francesco¹, Gabriella Di Francesco², Ludovica Di Renzo², Manuela Tittarelli², Antonio Petrella³, Carla Grattarola⁴, Sandro Mazzariol⁵, Eva Sierra⁶, Antonio Fernández⁶, and Giovanni Di Guardo^{1*}

¹University of Teramo, Faculty of Veterinary Medicine, Teramo, Italy; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) dell'Abruzzo e Molise "G. Caporale", Teramo, Italy; ³IZS della Puglia e Basilicata, Foggia, Italy; ⁴IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, CReDiMa, Turin, Italy; ⁵University of Padua, Department of Comparative Biomedicine and Food Science, Legnaro (PD), Italy; ⁶University of Las Palmas de Gran Canaria, Faculty of Veterinary Medicine, Las Palmas, Gran Canaria, Canary Islands, Spain.

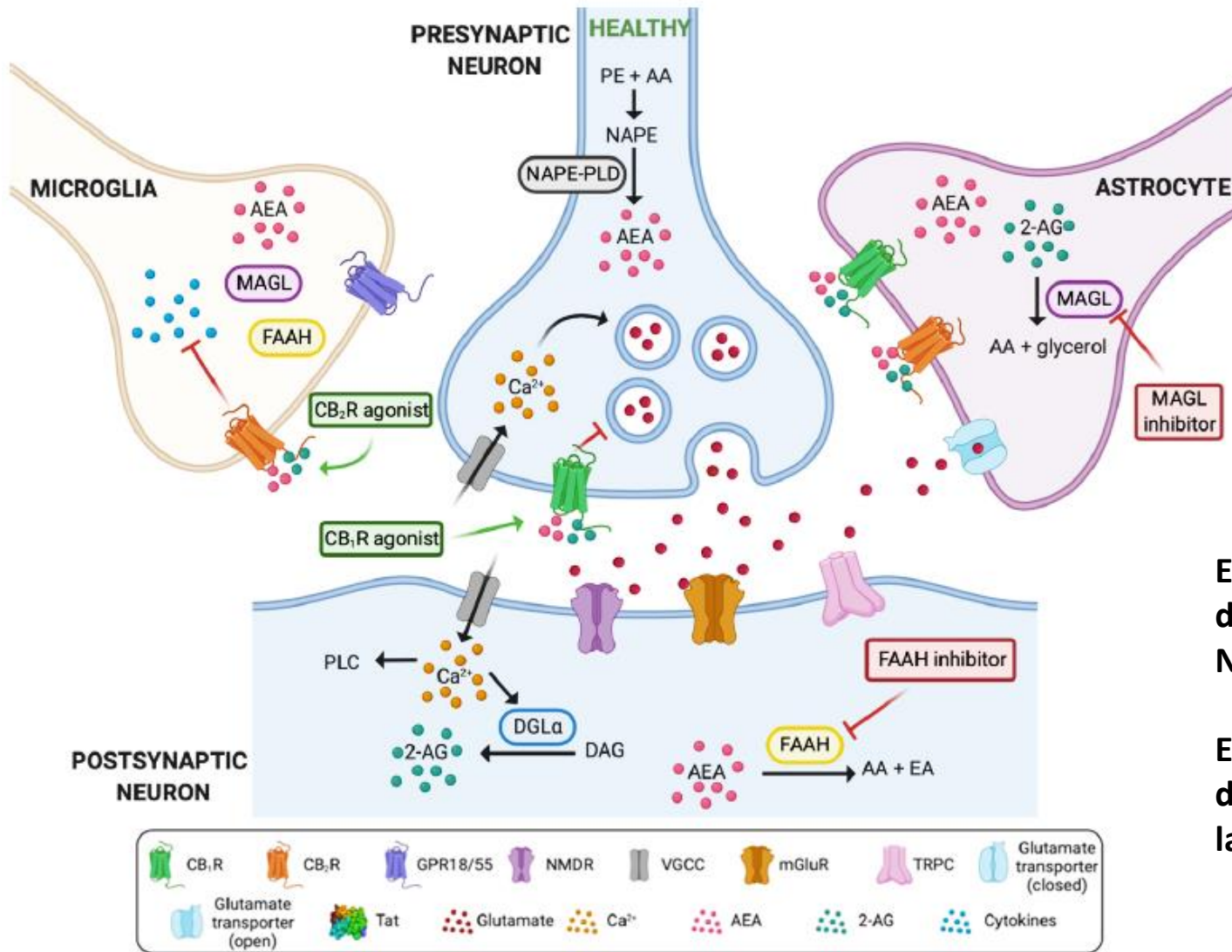
*Corresponding author (e-mail address: gdiuardo@unite.it)

Immunoregulatory Role of Cannabinoids during Infectious Disease

Rosalía Hernández-Cervantes^a Mónica Méndez-Díaz^b Óscar Prospéro-García^b
Jorge Morales-Montor^a

- L'antagonista CB1, SR141716A, induce un effetto protettivo inibendo la replicazione batterica all'interno dei macrofagi infetti in modo dose-dipendente (10-500 nM).
- Anche una sua concentrazione di 1 nM può causare un effetto battericida compromettendo la sopravvivenza di *Brucella suis* all'interno dei macrofagi.

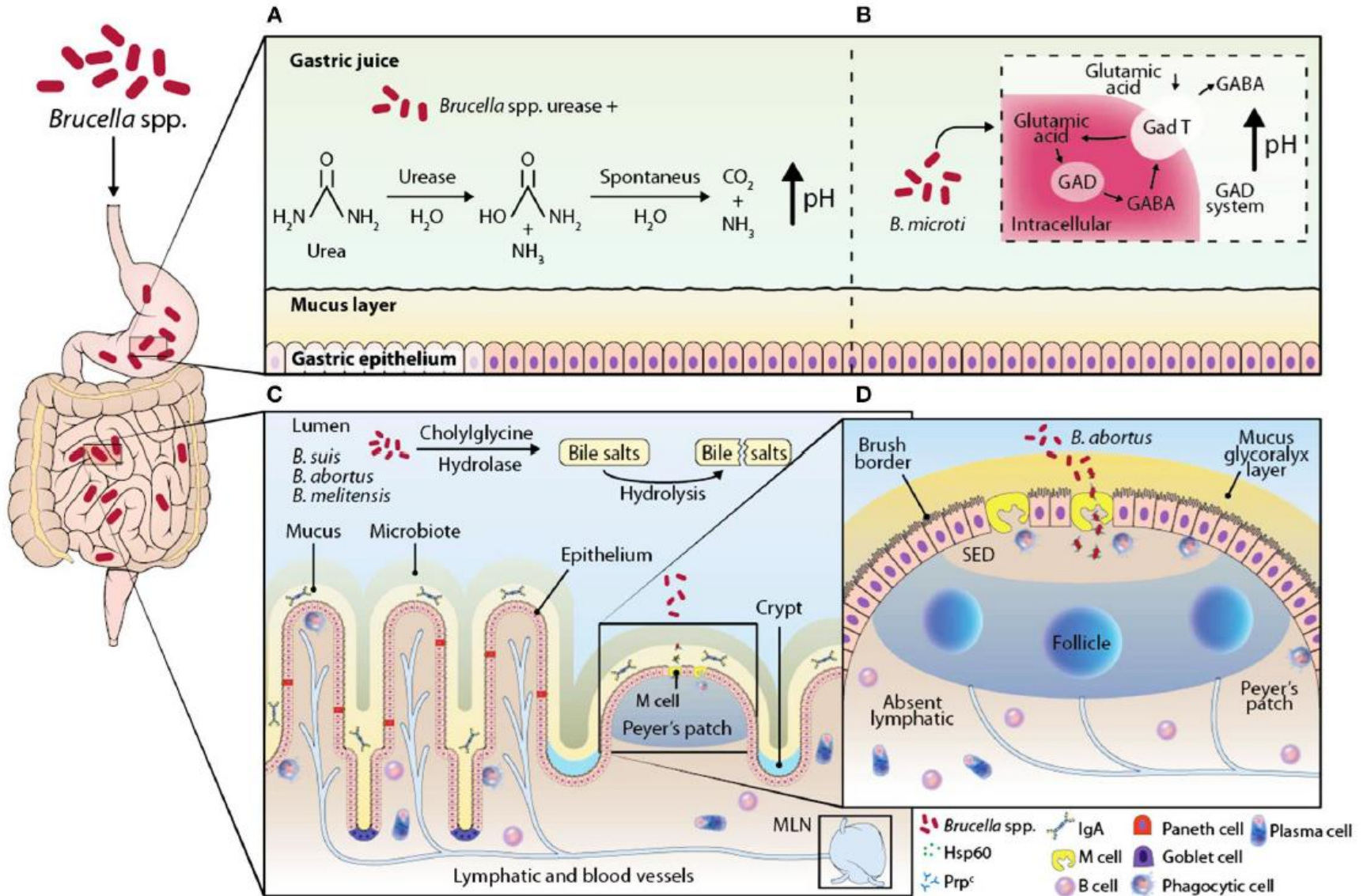
Rappresentazione schematica del sistema endocannabinoide in un individuo sano



Enzimi di sintesi e degradazione dell'AEA: NAPE-PLD e FAAH.

Enzimi di sintesi e degradazione del 2-AG: la DAGLα e la MAGL.

Risposta immunitaria nella mucosa intestinale all'infezione da *Brucella*

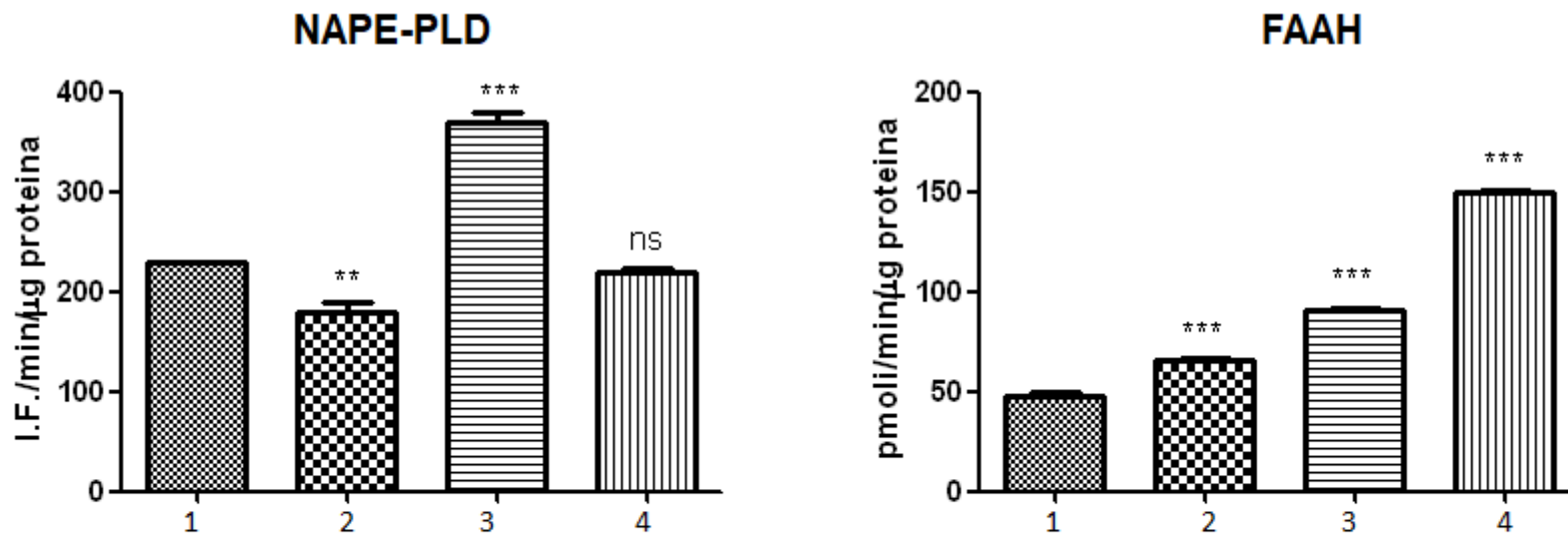




Scopi del lavoro

- Correlare ogni possibile variazione nei livelli di espressione e di attività enzimatica delle proteine dell'ECS congiuntamente alla presenza ed ai livelli di espressione della PrPc nel tessuto cerebrale di esemplari di *stenella* striata neurobrucellosi-afetti e non e con e senza infezione da *Brucella ceti*.

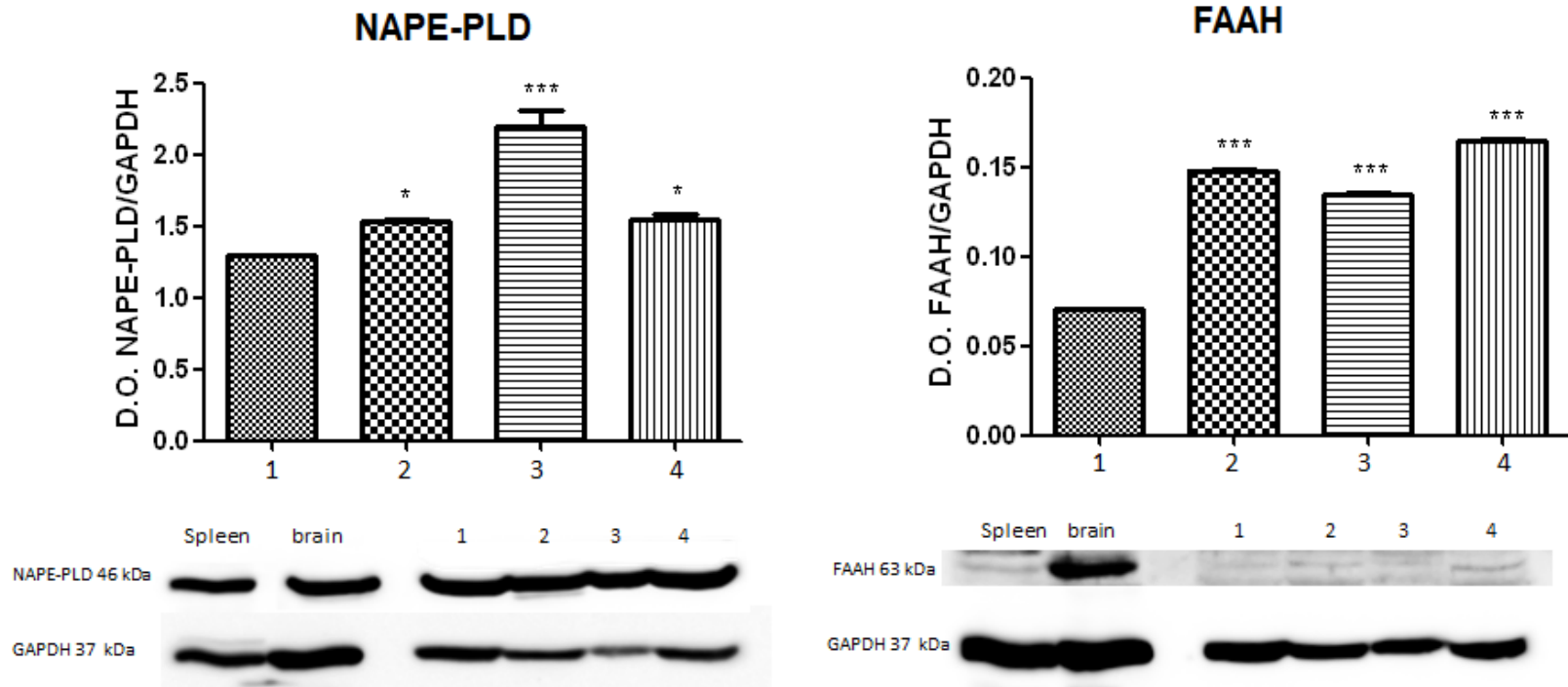
Attività degli enzimi di sintesi e degradazione dell'anandamide nel tessuto cerebrale di *Stenella*



Enzyme	1	2	3	4
NAPE-PLD	229,39 ± 11,4	178,67 ± 9,0	368,61 ± 18,4	220,65 ± 11,0
FAAH	48,04 ± 9,0	65,94 ± 1,7	91,06 ± 10,2	150,09 ± 21,3

Il controllo (*B. ceti-negativo*) è stato trovato spiaggiato lungo la costa tirrenica della Toscana (**corsia 1**), per *Stenelle* striate infettate da neurobrucellosi un esemplare è stato trovato lungo la costa Pugliese di Porto cesareo (**corsia 2**), un esemplare nelle Isole Canarie (**corsia 3**) e un altro nella costa pugliese (**corsia 4**). La tabella mostra i dati relativi alle attività enzimatiche espresse in IF/min/μg di proteina per NAPE-PLD e in pmol/min/μg per la proteina FAAH.

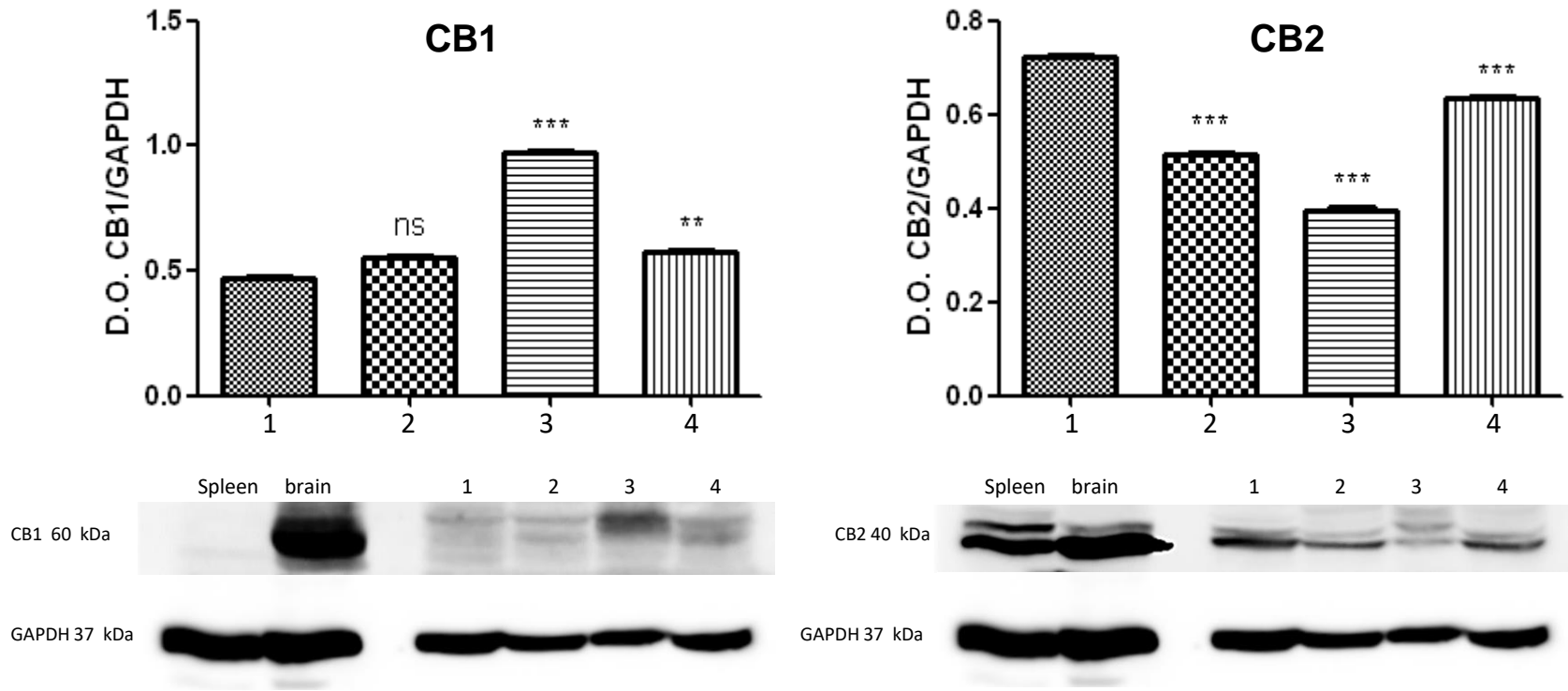
Analisi WB per le proteine di sintesi e degradazione dell'AEA nel tessuto cerebrale di *Stenelle*



Stenella striata di controllo (*B. ceti-negativo*) trovato spiaggiato lungo la costa tirrenica della Toscana (**corsia 1**), per le *Stenelle* striate infettate da neurobrucellosi un esemplare è stato trovato lungo la costa Pugliese di Porto Cesareo (**corsia 2**), un esemplare delle Isole Canarie (**corsia 3**) e un altro individuo della costa pugliese (**corsia 4**). Sono stati analizzati contemporaneamente anche campioni di milza e tessuto cerebrale di topo utilizzati come controlli per l'espressione delle proteine dell'ECS. La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo proteico.

- L'AEA può modulare le infezioni batteriche influenzando il sistema di intercomunicazione basato sul controllo della densità della popolazione batterica.
- Non è ancora noto come l'AEA possa interferire ma potrebbe rappresentare un nuovo tipo di meccanismo di difesa dei mammiferi.

Analisi del WB per i recettori cannabinici CB1 e CB2 nel tessuto cerebrale di *Stenelle*

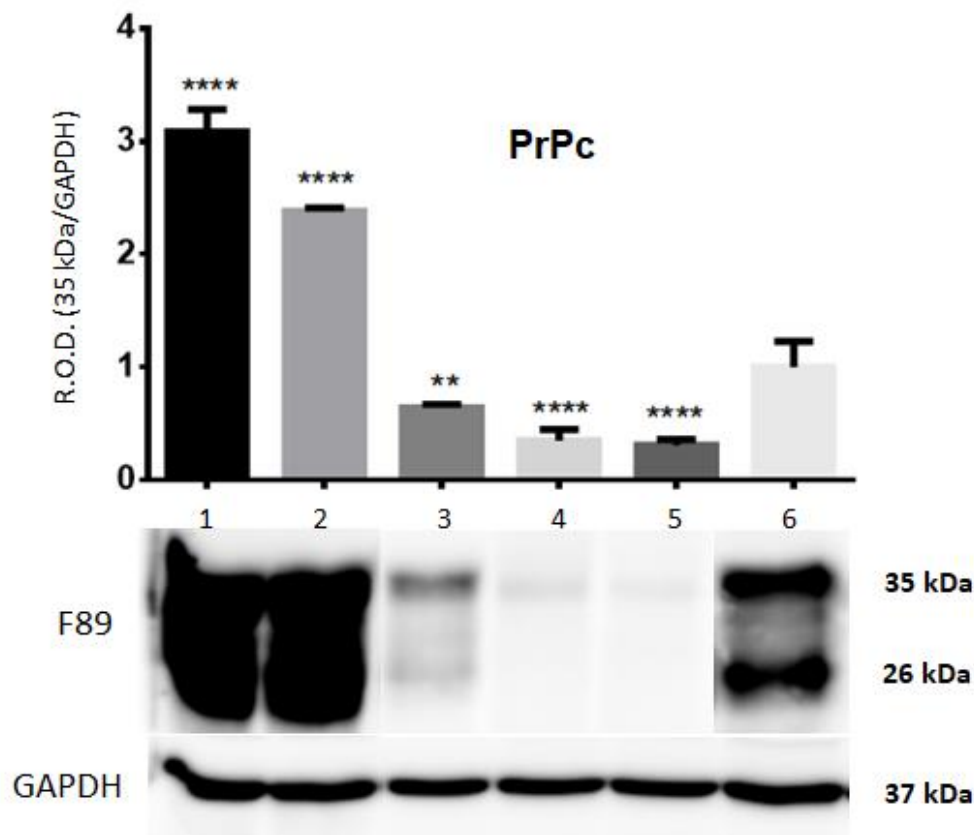


Stenella striata di controllo (*B. ceti-negativo*) trovato spiaggiato lungo la costa tirrenica della Toscana (**corsia 1**), per le *Stenelle* striate infettate da neurobrucellosi, un esemplare è stato trovato lungo la costa Pugliese di Porto Cesareo (**corsia 2**), un esemplare delle Isole Canarie (**corsia 3**) e un altro individuo della costa pugliese (**corsia 4**). Sono stati analizzati contemporaneamente anche campioni di milza e tessuto cerebrale di topo utilizzati come controlli per l'espressione delle proteine dell'ECS. La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo proteico.

L'espressione del rCB1 aumenta nei macrofagi attivati e nei linfociti T.

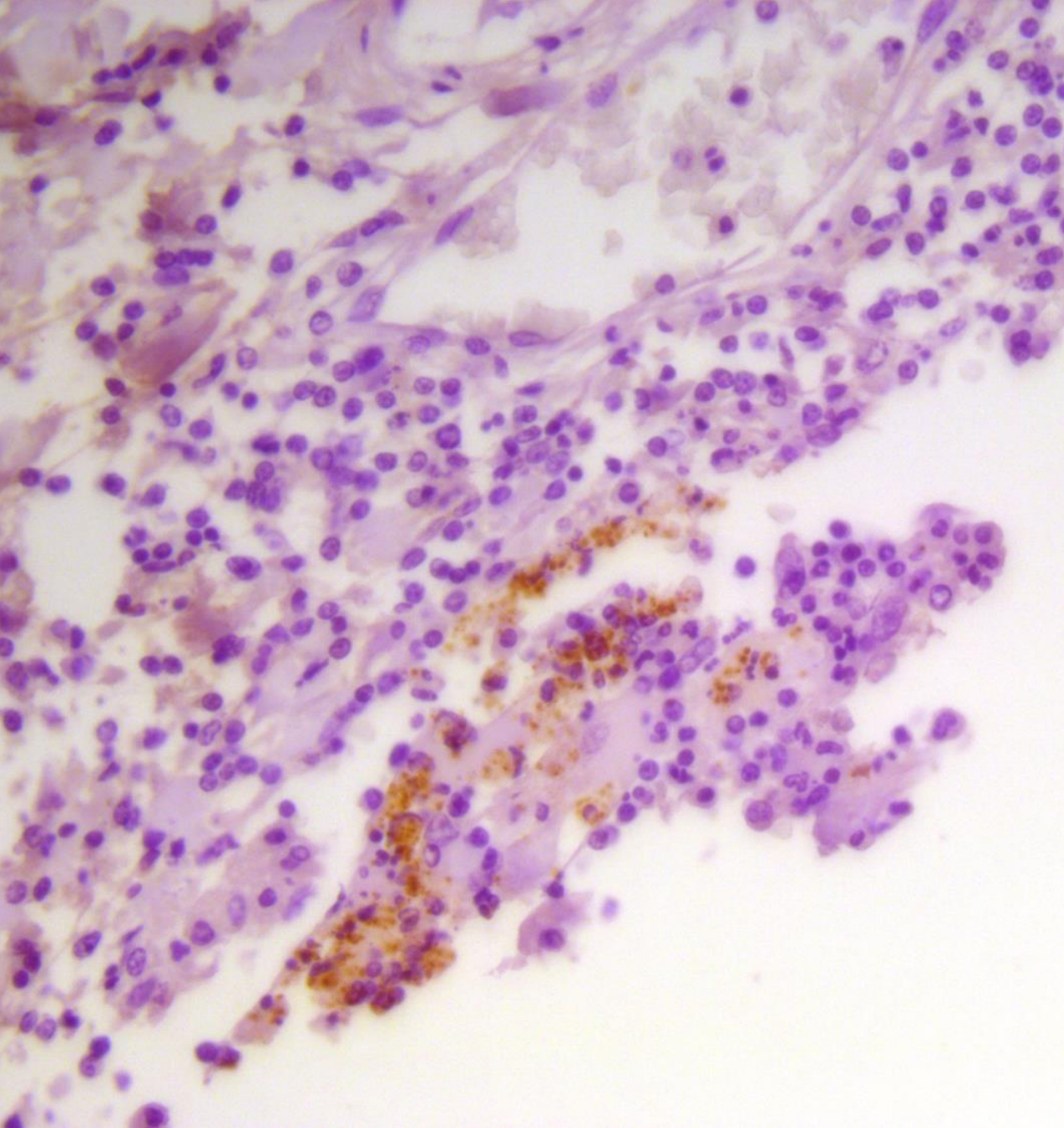
La stimolazione degli splenociti murini con LPS riduce l'espressione del rCB2 sulla membrana cellulare.

Analisi del WB per la PrPc nel tessuto cerebrale di delfino



Il WB mostra le tipiche bande di circa 35 e 26 kDa della proteina prionica cellulare (PrPc) ottenute con il MabF89/160.1.5. Nell'immagine vediamo il tessuto cerebrale di 3 esemplari di delfini spiaggiati, affetti da neurobrucellosi da *Brucella ceti*, lungo la costa Pugliese (corsia 1 e 3) e delle Isole Canarie (corsia 2). Inoltre, i risultati ottenuti sul cervello di agnello (corsia 4), capra (corsia 5) e delfino, come controllo negativo per *B. ceti* trovato spiaggiato lungo la costa tirrenica della Toscana (corsia 6). La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo proteico. Il grafico mostra solo la densità ottica ottenuta dalla banda 35 kDa.

La forte significatività statistica rilevata nei campioni affetti da neurobrucellosi e con infezione da *Brucella ceti*, potrebbe rafforzare l'ipotesi che la proteina prionica cellulare svolga il ruolo di recettore nei confronti di *B. ceti*.



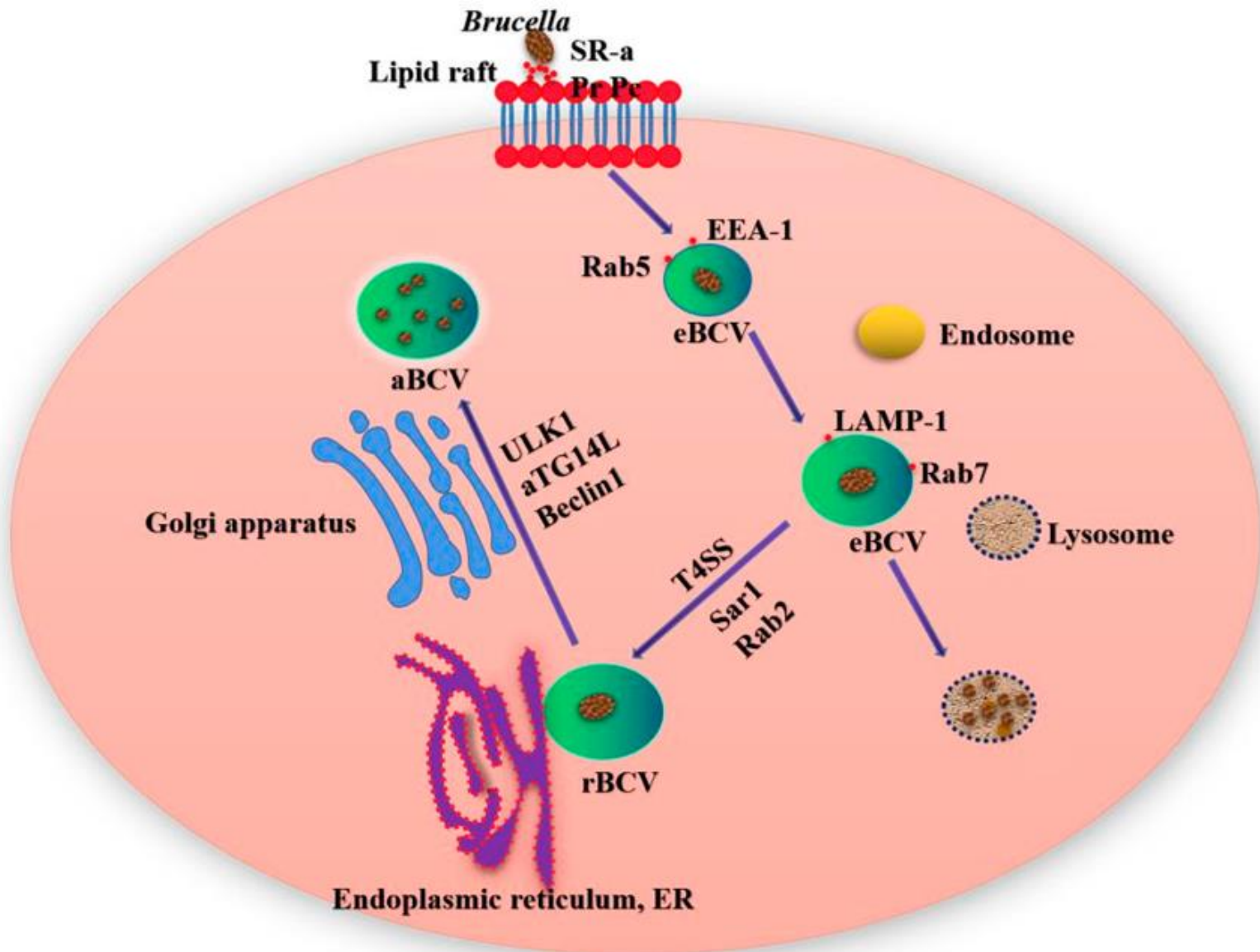
Midollo spinale cervicale di *Stenella striata* *Brucella ceti*-infetta con neurobrucellosi:

presenza di evidenti aggregati di antigene brucellare nel citoplasma di numerose cellule simil-macrofagiche componenti l'infiltrato infiammatorio.

Immunoistochimica per *Brucella spp.* con un Mab anti-*B. melitensis* prodotto presso l'IZSAM "G. Caporale", Teramo.

Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer.

***Brucella* interagisce con le zattere lipidiche della membrana cellulare dei macrofagi**



Conclusioni

- Per la prima volta abbiamo studiato il ECS nei mammiferi marini e, precisamente, nei delfini striati infettati da *B. ceti* e neurobrucellosi
- Le nostre indagini in Western blotting (WB) supportano l'ipotesi di un'interazione fra *Brucella ceti* e proteina prionica cellulare (PrPc) nella patogenesi della neurobrucellosi in esemplari di stenella striata (*S. coeruleoalba*) *B. ceti*-infetti

Obiettivi futuri

- *I nostri dati sull'espressione di ECS, pur essendo originali, sono preliminari e necessitano di ulteriori conferme*
- *Sarà necessario eseguire ulteriori indagini per caratterizzare in profondità le complesse dinamiche dell'interazione ospite-patogeno, con particolare attenzione al ruolo potenziale svolto dalla PrPc e dalle diverse molecole effettrici dell'ECS sulla patogenesi dell'infezione da B. ceti nei delfini striati*



Grazie a tutti per l'attenzione