

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

Cellule gliali enteriche murine sviluppano un fenotipo
Alzheimer Disease-like in seguito ad infezione del sistema
nervoso enterico con Herpes simplex virus di tipo 1

RELATORE: CHIAR.MO PROF IGNAZIO CASTAGLIUOLO

CORRELATORE: DR.SSA VERONICA ZATTA

LAUREANDO: ANNA TOPPARELLI

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

SOMMARIO

1. RIASSUNTO.....	1
2. INTRODUZIONE.....	12
2.1 HERPES SIMPLEX VIRUS DI TIPO 1.....	12
2.1.1 Caratteristiche generali	12
2.1.2 Dati epidemiologici.....	13
2.1.3 Manifestazioni cliniche dell'infezione da HSV-1.....	14
2.1.4 Struttura di HSV-1	16
2.1.5 Ciclo replicativo.....	18
2.1.6 Ruolo del sistema immunitario nell'infezione da HSV-1	23
2.1.7 Inibitori della replicazione di HSV-1	25
2.2 LA MALATTIA DI ALZHEIMER	27
2.2.1 Caratteristiche generali	28
2.2.2 Dati epidemiologici.....	29
2.2.3 Caratteristiche cliniche di AD: sintomi e segni.....	31
2.2.4 Fisiopatologia della malattia di Alzheimer	32
2.2.5 Fattori di rischio della malattia di Alzheimer	41
2.2.6 Terapia farmacologica.....	43
2.3 RELAZIONE TRA HSV-1 E ALZHEIMER	47
2.3.1 L'ipotesi infettiva.....	47
2.3.2 Dati epidemiologici.....	48
2.3.3 Meccanismi molecolari di HSV-1.....	50
2.3.4 Fattori genetici	55
2.3.5 HSV-1 e neuroinfiammazione	56
2.3.6 HSV-1 e stress ossidativo	58
2.4. SISTEMA NERVOSO ENTERICO E MALATTIA DI ALZHEIMER	60
2.4.1 Sistema nervoso enterico	60
2.4.2 Gli astrociti.....	63
2.4.3 Cellule gliali enteriche (CGE).....	68
2.4.4 Glia e neurodegenerazione.....	75
3. SCOPO DELLA TESI	78
4. MATERIALI E METODI.....	79
4.1 Modello murino di infezione in vivo da HSV-1 nel sistema nervoso enterico	79
4.2 Strip di plesso mienterico da ileo di topo.....	80
4.3 Analisi citofluorimetrica delle cellule del plesso mienterico murino	81
4.4 Coating di vetrini con poli-D-lisina e laminina.....	84
4.5 Allestimento di colture di cellule gliali enteriche dal plesso mienterico murino	85

4.6 Colorazione delle cellule gliali in coltura con Ematossilina e Eosina.....	87
4.7 Immunofluorescenza di cellule gliali enteriche.....	88
4.8 Estrazione dell'RNA da cellule gliali enteriche in coltura.....	91
4.9 Real-time PCR	93
4.10 Whole Mount di ileo murino in combinazione con immunofluorescenza	98
5.RISULTATI	101
5.1 Le cellule della glia enterica mostrano un fenotipo attivato con analisi citofluorimetrica	101
5.2 Aumentata immuno-reattività per S100 β nelle cellule della glia enterica	106
5.3 Allestimento e caratterizzazione di colture primarie di EGC dal plesso mienterico murino	107
5.4 Analisi di espressione genica nelle CGE.....	110
5.4.1 Espressione dei geni dell'immunità innata.....	112
5.4.2 Espressione di citochine e chemochine	114
5.4.3 Espressione dei geni della cascata del complemento	116
5.4.4 Espressione dei geni coinvolti nel metabolismo	117
5.4.5 Geni coinvolti nella proteolisi di APP.....	117
5.4.6 Realtime geni AD – Altro	118
5.5 Espressione di S100 β , TLR2 e TLR4 in cellule gliali enteriche isolate da topi HSV-1 _{4week}	119
6. DISCUSSIONE.....	124
7. CONCLUSIONI.....	129
8. BIBLIOGRAFIA.....	130
RINGRAZIAMENTI	149

INDICE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE

Figura 1: Gengivostomatite erpetica primaria in due giovani pazienti di sesso maschile	15
Figura 2: Herpes labialis in un paziente di sesso femminile allo stadio della crosta	15
Figura 3: Herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) struttura.....	17
Figura 4: Microscopia elettronica dei virioni di Herpes Simplex di tipo 1.....	18
Figura 5: Ciclo di HSV-1	21
Figura 6: Ciclo di vita di HSV-.....	23
Figura 7: Struttura chimica di 5-iodo-2’deossiuridina	25
Figura 8: Struttura chimica di Aciclovir	26
Figura 9: Struttura chimica di Valaciclovir.....	26
Figura 10: Struttura chimica di Penciclovir	27
Figura 11: Struttura chimica di Famciclovir	27
Figura 12: Numero di persone con demenza (milioni) nei paesi ad alto e medio reddito.....	30
Figura 13: Alterazioni macroscopiche della fisiopatologia dell’Alzheimer	33
Figura 14: Confronto tra neuroni in condizioni fisiologiche e neuroni in presenza della patologia di Alzheimer.....	34
Figura 15: Rappresentazione grafica dei due pathway molecolari di scissione dell’APP	36
Figura 16: Funzione fisiologica della proteina tau.....	39
Figura 17: L’iper-fosforilazione di tau porta alla formazione di filamenti elicoidali accoppiati	41
Figura 18: Struttura chimica di Donepezil.....	44
Figura 19: Struttura chimica di Galantamina.....	45
Figura 20: Struttura chimica di Rivastigmina	45
Figura 21: Rischio cumulativo di demenza tra soggetti di età pari o superiore ai 50 anni	49
Figura 22: L’infezione da HSV-1 porta all’accumulo di autofagosomi intracellulari	54
Figura 23: : Stress ossidativo.....	59
Figura 24: Organizzazione del Sistema Nervoso Enterico	61
Figura 25: Morfologia cellulare degli astrociti fibrosi e protoplasmatici	64
Figura 26: Condizione di astrogliosi.....	65
Figura 27: Struttura delle cellule gliali enteriche.....	69
Figura 28: Ciclo delle citochine con attivazione di eventi infiammatori auto-propaganti.....	76
Figura 29: Schema rappresentativo del legame tra antigene e anticorpo.....	90
Figura 30: Rappresentazione della fase di “Annealing” della Real Time PCR	94
Figura 31: Step della reazione PCR con le relative temperature in°C	98
Figura 32: Analisi citofluorimetrica di LMMP per GFAP.....	101
Figura 33: Analisi citofluorimetrica di EGC nell’LMMP.....	103

Figura 34: Immagini ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni Whole Mount (WM)	106
Figura 35: Coltura in adesione di cellule gliali enteriche isolate da LMMP di ileo di topo CT.	107
Figura 36: Colorazione con Ematossilina e Eosina di cellule gliali enteriche isolate.	108
Figura 37: Immunofluorescenza di cellule gliali enteriche isolate da LMMP	109
Figura 38: Valutazione dell'espressione genica tramite Real Time PCR.	112
Figura 39: :Immunofluorescenza per S100b in cellule gliali enteriche isolate da LMMP.....	120
Figura 40: Immunofluorescenza per TLR2 in cellule gliali enteriche isolate da LMMP	121
Figura 41: Immunofluorescenza per TLR4 in cellule gliali enteriche isolate da LMMP	122
Tabella 1: Anticorpi primari e secondari utilizzati per l'analisi citofluorimetrica	83
Tabella 2: Anticorpi prima e secondari utilizzati in immunofluorescenza.....	90
Tabella 3: Geni utilizzati nella Real time PCR con le relative sequenze primer.....	95
Tabella 4: Anticorpi primari e secondari utilizzati in Whole Mount	99

1.RIASSUNTO

Il *Center for Disease Control* ha stimato che attualmente ci sono oltre 55 milioni di persone nel mondo affette da demenza e la maggior parte dei casi sono correlati alla malattia di Alzheimer (AD) e si ritiene che questo numero raddoppierà quasi ogni vent'anni, raggiungendo i 78 milioni nel 2030 e i 139 milioni nel 2050. La malattia di Alzheimer a livello macroscopico si caratterizza per l'atrofia dell'ippocampo e della corteccia cerebrale, mentre a livello microscopico è tipica la presenza di placche amiloidi extracellulari composte da aggregati insolubili della proteina amiloide- β ($A\beta$) e grovigli neurofibrillari intraneuronali, composti dalla proteina tau iper-fosforilata. Diverse ipotesi patogenetiche sono state avanzate per spiegare l'insorgenza dell'AD: tra queste l'ipotesi infettiva, che ritiene un agente infettivo responsabile di innescare la neurodegenerazione, è attualmente particolarmente attenzionata dagli studiosi. Tra gli agenti infettivi oggetto di approfonditi studi è l'Herpes simplex virus di tipo 1, un virus neurotropico appartenente alla famiglia delle *Herpesviridae*. A seguito dell'infezione primaria, acquisita generalmente nei primi anni di vita, il virus stabilisce un'infezione latente permanente nel ganglio del Gasser. HSV-1 in latenza nel ganglio del trigemino può riattivarsi ed essere trasportato sia a livello della mucosa labiale/orale (herpes labiale) o risalire le fibre nervose fino alle aree limbiche del cervello (ippocampo, lobi temporali e frontali). Un grosso limite allo studio dei meccanismi con cui l'HSV-1 può causare, nel corso di una infezione cronica, neuro-degenerazione è la mancanza di un modello sperimentale adeguato. A tal proposito nel nostro laboratorio di ricerca è stato messo a punto un modello di infezione persistente da HSV-1 del sistema nervoso enterico (SNE) che prevede l'infezione prima per via intranasale, seguita dopo 4 settimane dall'inoculo intragastrico del virus. Utilizzando questo modello sperimentale, in precedenti studi, è stato dimostrato che il virus stabilisce un'infezione persistente nei neuroni del SNE e va incontro a riattivazioni spontanee, causando l'accumulo dei classici marcatori di neuro-degenerazione. Poiché nelle patologie neurodegenerative come AD è stato riportato un coinvolgimento della glia, in questo progetto di tesi

abbiamo verificato se il fenotipo delle cellule gliali enteriche (CGE) in corso di infezione persistente da HSV-1, sia compatibile con quanto osservato nei pazienti con AD. Difatti, in seguito ad alterazioni dell'omeostasi cerebrale, si instaura nel SNC una condizione di astrogliosi o gliosi reattiva, processo di attivazione e di proliferazione degli astrociti, che aumentano l'espressione di GFAP e rilasciano chemochine, citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita. Inoltre gli astrociti reattivi esprimono BACE-1 (secretasi coinvolta nella proteolisi di APP, Amyloid Precursor Protein), esprimono livelli elevati di APP e, quindi, possono contribuire alla produzione di A β .

Nei topi con infezione da HSV-1 abbiamo riscontrato, mediante analisi in citofluorimetria a flusso, un aumento della percentuale di CGE (GFAP+) IFN γ +, CD14+, S100 β +, TLR2+, TLR4+, indicativo di uno stato di attivazione (astrogliosi). Mediante microscopia confocale su preparati whole mount dello strato muscolare longitudinale (LMMP) dell'ileo, abbiamo confermato l'aumento della immuno-reattività per S100 β e per TLR4 nelle cellule della glia enterica a partire dalla quarta settimana post-infezione. Per meglio caratterizzare il fenotipo delle CGE, abbiamo allestito e caratterizzato delle culture primarie di CGE a partire da preparati di LMMP di topi controllo ed infetti da 4 settimane. In particolare abbiamo esaminato il livello di espressione di una serie di geni la cui espressione è stata ritrovata significativamente modificata nella astroglia del SNC in modelli murini di AD. Dalle nostre analisi è emerso che, in accordo ad un fenotipo AD-like delle CGE, 1) Sc4mol e Gdp1 (geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo, dei carboidrati e dei lipidi) sono down-regolati nel topo infetto; 2) Cd14 e Ly86 (geni appartenenti alla risposta immunitaria) sono up-regolati; 3) Ccl3 (chemochina coinvolta nel reclutamento dei neutrofilo nella risposta infiammatoria acuta) risulta essere up-regolato; 4) Trem2, Cst7 e Tyrobp (geni che codificano per proteine coinvolte nella risposta immunitaria, nei processi di trasduzione del segnale e nella produzione di citochine pro-infiammatorie) risultano essere up-regolati.

In conclusione, l'analisi del fenotipo delle cellule gliali enteriche nei topi infetti per via orogastrica con HSV-1 ha evidenziato numerose caratteristiche in linea con quanto riportato in letteratura per la glia del SNC in corso di malattia di

Alzheimer confermando la rilevanza del modello sperimentale utilizzato nel nostro studio. Pertanto questo modello sperimentale rappresenta un'ottima piattaforma per studiare sia il comportamento della glia nel corso delle malattie neurodegenerative e comprenderne i meccanismi molecolari, che per lo sviluppo di interventi terapeutici mirati atti ad influenzare il danno neuronale.

2. INTRODUZIONE

2.1 HERPES SIMPLEX VIRUS DI TIPO 1

Il virus Herpes Simplex di tipo 1 è uno dei virus più diffusi della famiglia *Herpesviridae*, una grande famiglia di virus a DNA che causa infezioni e malattie negli animali e negli esseri umani. Tale famiglia comprende più di 200 specie e alla fine degli anni '70 è stata suddivisa in tre sottofamiglie:

- la sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*: ad essa appartengono virus litici con ciclo di vita relativamente breve che si replicano rapidamente e stabiliscono la latenza prevalentemente nei gangli sensoriali. Comprende il virus Herpes Simplex (HSV-1 e HSV-2) e il virus della varicella zoster (VZV).
- la sottofamiglia *Betaherpesvirinae*: comprende virus con lungo ciclo di vita e lenta progressione dell'infezione, causando in tal modo un aumento di dimensioni delle cellule infette (citomegalia); l'infezione si localizza prevalentemente nelle ghiandole esocrine, nelle cellule linfo-reticolari e nei reni. Comprende Citomegalovirus umano (CMV) e roseolovirus (HHV-6).
- la sottofamiglia *Gammaherpesvirinae*: include il virus dell'herpes associato al sarcoma di Kaposi (HHV-8), il virus di Epstein-Barr (EBV) che causa il linfoma di Burkitt e la mononucleosi infettiva.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, i virus della famiglia *Herpesviridae* infettano il 90% della popolazione terrestre e tra questi il più diffuso è l'Herpes Simplex di tipo 1.¹

2.1.1 Caratteristiche generali

Nell'antica Grecia, il medico Ippocrate (460-377 a.C) chiamava le lesioni, causate apparentemente da HSV-1, con il termine "Herpes". La parola deriva dal greco "*herpein*" che significa "strisciare, essere furtivo" ed esprime la caratteristica del

virus di disseminarsi sulla cute e di formare lesioni le une vicine alle altre (vescicole). In seguito, Erodoto fu il primo storico a chiamare la malattia “herpes febbrile” quando essa si manifestava con febbre, vesciche in bocca e piaghe sulle labbra. L’infezione causata dal virus Herpes simplex rappresenta una delle infezioni più diffuse e ne distinguiamo due tipi: Herpes Simplex Virus di tipo 1 (HSV-1) e di tipo 2 (HSV-2): il primo infetta la regione oro-facciale, il secondo infetta a livello genitale.² HSV-1 è un virus neurotropico con siero-prevalenza stimata fino all’85% nella popolazione adulta.³ La maggior parte delle infezioni virali vengono acquisite attraverso il contatto diretto con una lesione o con fluidi corporei infetti (saliva, essudati di lesioni attive).² L’infezione primaria avviene quindi a livello delle cellule della mucosa orale dove il virus si replica nell’epitelio squamoso stratificato; segue l’ingresso nella ramificazione delle fibre nervose sensoriali non mielinizzate all’interno dell’epitelio squamoso stratificato e, tramite trasporto retrogrado, nel ganglio trigemino. Qui l’infezione acuta è seguita da un’ infezione latente permanente.⁴ In seguito a riattivazione, il virus viene trasportato, tramite trasporto anterogrado associato ai microtubuli, nell’epitelio squamoso stratificato della pelle o della mucosa dove si replica e rilascia particelle infettive nelle secrezioni orali.⁴ HSV-1 ha difficoltà a penetrare nello strato corneo tranne quando sono presenti crepe o abrasioni o quando lo strato è sottile, consentendo l’accesso ai recettori di superficie sui cheratinociti epidermici.

2.1.2 Dati epidemiologici

Il virus HSV-1 è un patogeno umano altamente diffuso tra la popolazione adulta. È stato stimato che 3,7 miliardi di persone siano infette da HSV-1 (il 67% della popolazione mondiale), con una più alta prevalenza in Africa, Sud-Est asiatico e Pacifico occidentale. La prevalenza varia a seconda del paese o regione e aumenta con l’età, con diversi studi che dimostrano una prevalenza dell’80-95% nella popolazione di età pari o superiore ai 50 anni. Negli Stati Uniti è stato stimato che

ci sono 500000 infezioni primarie all'anno e che il 27,1% delle persone di età compresa tra ≥ 12 anni erano sieronegativi, il 51% era positivo solo per HSV-1 e il 16,6% delle persone era co-infettato da HSV-1 e HSV-2; significativamente più maschi (31,4%) rispetto alle femmine (23,2%) erano sieronegativi per l'infezione da HSV; la sieroprevalenza di HSV-1 è aumentata solo con l'età dal 40% nei 12-19 anni al 64,5% nel ≥ 70 anni.² Con il miglioramento dell'igiene e delle condizioni di vita, la sieroprevalenza di HSV-1 è diminuita, almeno nei paesi occidentali in molte popolazioni industrializzate di classe media.⁵ Ad esempio, nel Regno Unito, la sieroprevalenza di HSV-1 nelle popolazioni preadolescenti è diminuita dal 63% nel 1953 al 23% negli anni 2000, probabilmente a causa del miglioramento delle condizioni socioeconomiche in questo lasso di tempo.² La maggior parte delle infezioni si verifica durante l'infanzia, per contatto diretto con una lesione o fluidi infetti (ad esempio secrezioni orali), con potenziale permanenza del virus per tutta la vita dell'ospite.⁶

Solitamente le infezioni sono asintomatiche e non mostrano sintomi apparenti; il 60% dei pazienti non sviluppa vescicole dopo l'infezione, facilitando in questo modo la trasmissione orizzontale del virus nella popolazione. Quando sintomatica, l'infezione è caratterizzata da lesioni orali o facciali (herpes labiale).⁵

2.1.3 Manifestazioni cliniche dell'infezione da HSV-1

Le principali manifestazioni cliniche in seguito a infezione da HSV-1 sono le seguenti:

- Gengivostomatite erpetica primaria: vesciche di 1-2 mm che si rompono e si fondono per formare piccole ulcere irregolari poco profonde e dolorose, coperte da una pseudomembrana grigio-giallastra e circondate da un alone eritematoso. Le ulcere guariscono gradualmente in 10-14 giorni senza lasciare cicatrici. Si può avere inoltre gonfiore diffuso delle gengive, perdita di appetito, ipersalivazione, irritabilità difficoltà a deglutire a causa del dolore associato, cattivo odore orale aggravato dalla difficoltà nel mantenere una buona igiene orale a causa del dolore gengivale.

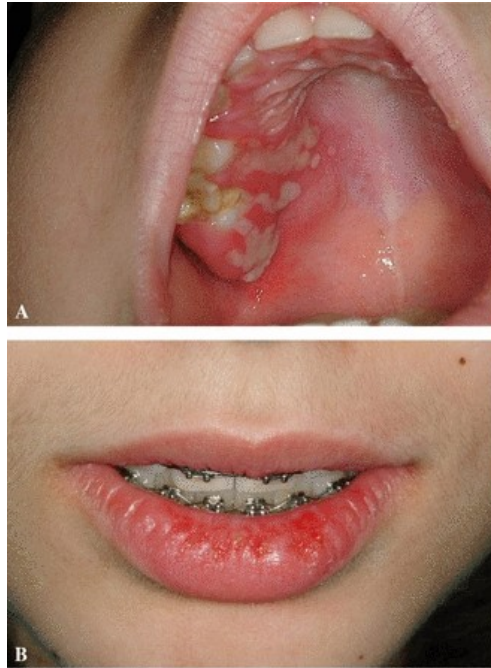


Figura 1: Gengivostomatite erpetica primaria in due giovani pazienti di sesso maschile²

- Infezione erpetica ricorrente (herpes labialis): la riattivazione del virus nel ganglio sensoriale provoca infezioni erpetiche ricorrenti cutanee e mucocutanee. Questa riattivazione può avvenire spontaneamente o essere innescata da vari fattori come febbre, raggi UV, raffreddore, stress emotivo, immunosoppressione o traumi. Le lesioni si verificano sulle labbra e sono accompagnate da parestesie, dolore, sensazione di bruciore e prurito. Sono macule rosse che diventano vescicolari, formando in seguito croste pustolose e ulcere.



Figura 2: Herpes labialis in un paziente di sesso femminile allo stadio della crosta³

- Infezione erpetica cutanea: dolore locale, formicolio, sensazione di bruciore, seguito da un' eruzione vescicolare acuta, che colpisce la falange distale di uno o più dita. Inizialmente le lesioni contengono liquido chiaro che diventa successivamente torbido, a causa della presenza di leucociti.
- Infezioni erpetica oculari: la malattia oculare primaria dovuta a HSV-1 dà origine a blefarite, congiuntivite, cheratite erpetica epiteliale, cheratite stromale o retinite. Probabilmente il virus dalla contaminazione delle mani può essere diffuso negli occhi.²

2.1.4 Struttura di HSV-1

HSV-1 è un virus a DNA a doppio filamento con un genoma di 152kb ricco di GC (G+C 68%). Strutturalmente, come si può osservare dalla **Figura 3**, il virione è costituito da tre elementi strutturali:

- *Nucleocapside*: struttura di diametro 100nm, che racchiude il genoma virale; è costituito da 162 capsomeri (150 esoni e 12 pentoni) che si dispongono a formare un icosaedro. Dalle cellule infette si possono isolare tre tipi di capsidi: A-capsidi (pro-capsidi), mancano sia di proteine strutturali che di DNA virale; B-capsidi, non contengono DNA virale ma contengono l'impalcatura proteica per esso; C-capsidi, contengono il genoma virale. Tutti i capsidi, indipendentemente dal tipo, sono costituiti da 4 proteine: la proteina principale del capsidi UL19 (VP5), la proteina accessoria UL35 (VP26) e le proteine UL18 (VP23) e UL38 (VP19C), le cui funzioni non sono ancora ben note. Sei copie della proteina principale del capsidi, VP5, formano gli esoni e cinque copie formano i pentoni. Sei copie di VP26 occupano le superfici esterne degli esoni formati da VP5; una singola molecola di VP19C e due copie di VP23 formano una tripletta che lega i capsomeri circostanti per formare connessioni tra di loro. Al centro di

ogni capsomero è presente un canale che unisce la superficie esterna del virione e il nucleo.⁷

- *Tegumento*: struttura amorfa che circonda il capsid e contiene 26 proteine virali, necessarie per il ciclo di vita del virus, tra cui il trasporto del DNA virale all'interno dell'ospite, la trascrizione dei geni virali e la soppressione della biosintesi di proteine cellulari.
- *Involucro o envelope*: doppio strato lipidico costituito da 12 glicoproteine incorporate, che fungono da proteine di ancoraggio alla membrana cellulare, proteine di fusione, proteine strutturali e proteine con un ruolo nella fuga immunitaria. Quattro di queste (gD, gH, gL e gB) sono necessarie per la penetrazione del virus all'interno della cellula ospite.⁸

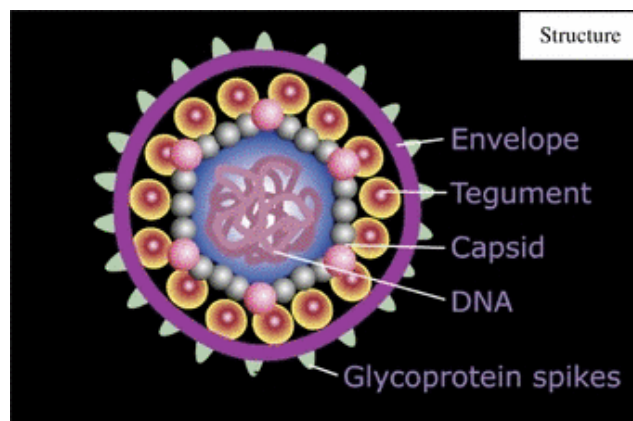


Figura 3: Herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) struttura



Figura 4: Microscopia elettronica dei virioni di Herpes Simplex di tipo 1. Si può notare il capsid centrale, al cui interno è contenuto il genoma virale a doppio filamento, circondato a sua volta dal tegumento e dall'envelope

Il genoma del virus è costituito da due segmenti uniti covalentemente, L (Long) e S (Short), affiancati da ripetizioni invertite e ripetute IR_L e TR_L e IR_S e TR_S che facilitano la replicazione del genoma.² Il genoma di HSV-1 codifica per 90 unità trascrizionali e almeno 84 di queste codificano proteine; durante l'infezione vengono espressi diversi geni che vengono classificati in α (precoci- immediati), β (precoci) o γ (tardivi), a seconda del punto del ciclo replicativo in cui inizia la trascrizione.

2.1.5 Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo di HSV-1, della durata di 18-20 ore, può essere suddiviso in diverse fasi: ingresso nella cellula ospite, espressione di geni virali, replicazione, assemblaggio di virioni, uscita delle nuove particelle virali.

HSV-1 può sfruttare due meccanismi diversi per l'ingresso nella cellula ospite:

- fusione dell'involucro virale con la membrana plasmatica e trasporto del capsid virale al nucleo; questo avviene grazie all'interazione delle glicoproteine virali con i glicosaminoglicani presenti sulla superficie della cellula, in particolare l'eparan solfato.

- endocitosi del virione, seguita dalla fusione dell'involucro con vescicole intracellulari.

Il legame del virus alla superficie cellulare è mediato dalle glicoproteine virali (gC) e g(B), che interagiscono con i glicosamminoglicani di superficie cellulare, in particolare l'eparan solfato.⁹ Questo legame iniziale è seguito dall'interazione della glicoproteina D (gD) con recettori della superficie cellulare come nectina-1 e nectina-2 (mediatori di ingresso del virus dell'Herpes), permettendo in questo modo la fusione dell'involucro virale con la membrana plasmatica cellulare.² La glicoproteina gB, inoltre, sembrerebbe legare, in modo indipendente dal legame con i proteoglicani eparan-solfato, anche i recettori PIL α (Paired Immunoglobulin-Like type 2 receptor α) permettendo così la fusione dell'involucro virale con la membrana plasmatica e la penetrazione del virus all'interno della cellula ospite.⁹ Dopo l'ingresso della particella virale, il capsido viene trasportato al nucleo lungo la rete dei microtubuli grazie a proteine motorie (dineina, dinactina, chinesina-1 e chinesina-2). Il capsido però non lega le proteine motorie; presumibilmente, quando l'involucro esterno del virione è fuso con la membrana cellulare, le proteine del tegumento esterno rimangono legate alla membrana mentre le proteine del tegumento interno si legano alle proteine motorie. La proteina del tegumento interno UL36 è fondamentale nell'indirizzare il capsido virale al nucleo; la sua interazione con le nucleoporine Nup358 e Nup214 permette il legame del capsido al complesso dei pori nucleari e il successivo trasferimento del genoma virale all'interno del nucleo.⁹ La trascrizione e la replicazione del genoma virale avvengono all'interno del nucleo. Per la trascrizione dei geni virali α , un ruolo cruciale è svolto dalla proteina VP16. I geni α contengono diverse copie della sequenza consenso 5'-GyATGnTAATGArATTCyTTGnGGG-3', dove y è una base di pirimidina, r è una base purinica, n può essere qualsiasi base. Il fattore di trascrizione cellulare Oct-1, dopo essersi legato a questa sequenza, si lega alla proteina VP16, la quale a sua volta interagisce con la proteina HCFC1 e forma un complesso che attiva la trascrizione dei geni α . A questi appartengono i geni precoci-immediati ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e US1.5; cinque di questi (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e US1.5) attivano la trascrizione dei geni β . Le proteine e gli enzimi codificati dai geni β precoci sono coinvolti nella replicazione del

genoma virale (attivazione della DNA polimerasi), nella regolazione del metabolismo dei nucleotidi, nella soppressione dei geni α e nell'attivazione dei geni γ tardivi. Questi ultimi codificano per proteine strutturali della particella virale che, una volta assemblata, viene rilasciata dalla cellula ospite per gemmazione.⁹ Il primo step necessario per la replicazione del DNA è lo svolgimento della doppia elica da parte delle proteine UL9 e ICP8 (UL29) a livello di regioni ricche di adenina e timina; queste proteine hanno attività elicastica e permettono la separazione dei due filamenti di DNA. L'enzima chiave per la replicazione del DNA virale è la HSV-1 DNA polimerasi (UL30), complessata con il fattore di processività UL42. Dopo l'inizio della replicazione del DNA virale, si ha un aumento dell'espressione dei geni tardivi, in particolare la codifica delle proteine del capsido, permettendo l'assemblaggio dei virioni della progenie. Questo processo avviene nel nucleo ed è seguito dall'uscita del nucleocapsido attraverso il poro nucleare e il suo trasporto nel citoplasma, grazie alle proteine UL36 e UL37. Nel citoplasma si ha la formazione del capsido e, in seguito al rilascio del virione dalla cellula per esocitosi, la formazione dell'envelope. Come per l'ingresso del virus nella cellula ospite, l'uscita del virione è associato al trasporto basato sui microtubuli e all'interazione di UL37 con la proteina distonina motoria.⁹

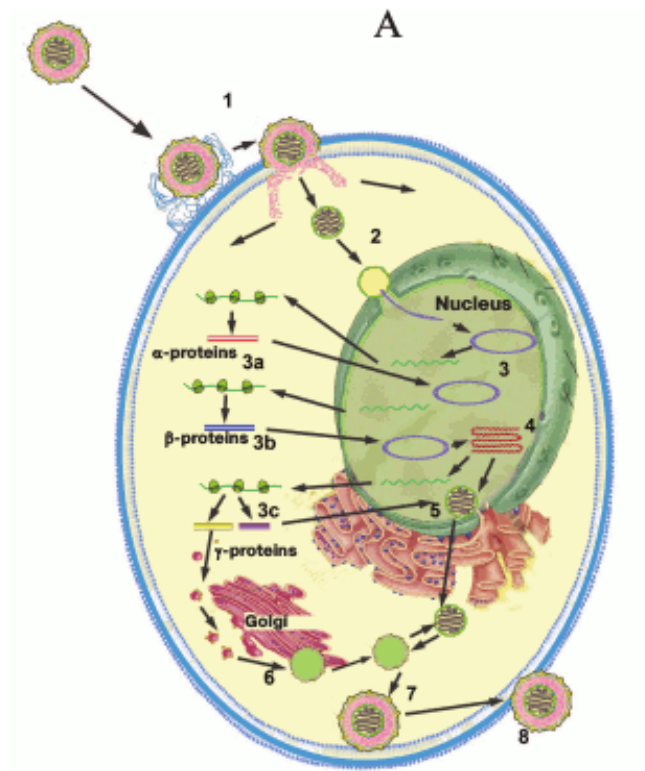


Figura 5: Ciclo di HSV-1

2.1.5.1 Latenza di HSV-1

Il ciclo vitale di HSV-1 comprende sia una fase litica (produttiva, dove vengono prodotti nuovi virioni che portano alla morte della cellula ospite) sia una fase latente di infezione (non produttiva, dove il genoma virale rimane all'interno della cellula ospite senza formazione di virioni).¹⁰ Nonostante una vigorosa risposta immunitaria durante l'infezione acuta, il virus stabilisce una latenza all'interno dei gangli sensoriali, come il ganglio trigemino (TG) del sistema nervoso periferico, che consente di mantenere il genoma virale in una forma non patogena e non replicativa. L'infezione dura per tutta la vita perché il virus è in grado di sfuggire al sistema immunitario dell'ospite.¹⁰ In seguito all'infezione acuta dell'epitelio della mucosa orale, nasale o oculare, il virus penetra all'interno del neurone sensoriale e, attraverso un trasporto retrogrado all'interno dell'assone, migra verso il corpo cellulare dei gangli sensoriali dove stabilisce la latenza. Durante questa

fase, l'espressione genica virale viene soppressa, ad eccezione di un trascritto associato alla latenza (*Latency Associated Transcript*, LAT). In particolare, LAT è un trascritto di 2kb che svolge due funzioni: sopprime l'apoptosi indotta da caspasi 8 e caspasi 9, in modo che le cellule ospiti infette in cui HSV-1 instaura la condizione di latenza rimangano vive, e sopprime l'espressione dei geni litici durante l'infezione latente. LAT inibisce l'espressione di ICP0, uno dei principali geni virali precoci, e inibisce così la replicazione virale. Inoltre, come spiegato precedentemente, la trascrizione dei geni virali può avvenire solo in seguito alla formazione di un complesso costituito da VP16-Otc1 e HCFC1.¹¹ HFC1 è un attivatore della trascrizione cellulare costituito da subunità ammino e carbossi terminali che interagiscono e formano un complesso con Oct-1 e la proteina VP16; svolge un ruolo significativo nella regolazione della latenza virale nei neuroni sensoriali. HCF-1 viene sequestrato nel citoplasma e trasportato al nucleo dopo opportuna stimolazione che promuove la riattivazione virale.¹² VP16 è un fattore di trascrizione di 490 amminoacidi coinvolto nell'attivazione di geni virali immediati-precoci; è contenuto all'interno del virione e rilasciato nelle cellule dopo l'infezione. Si lega alla proteina nucleare cellulare HCF-1 attraverso il suo dominio principale e successivamente a Otc-1, un'altra proteina nucleare ospite, per formare un complesso proteico a tre componenti. Questo complesso si lega alla sequenza di DNA bersaglio TAATGARAT (dove R è una base purinica) nei promotori di geni immediati-precoci.¹³ Durante la fase di latenza, l'espressione di questi fattori è notevolmente ridotta e si inibisce così la trascrizione di geni virali. In seguito a stress, traumi o condizioni di immunosoppressione si riattiva l'espressione genica virale. Si possono distinguere tre fasi sequenziali: espressione dei geni immediati-precoci, espressione dei geni precoci e successiva espressione dei geni tardivi. Quando HSV-1 viene riattivato, i virioni di nuova produzione diffondono dai neuroni infetti mediante trasporto anterogrado ai siti muco-cutanei e possono essere rilasciati nella saliva.²

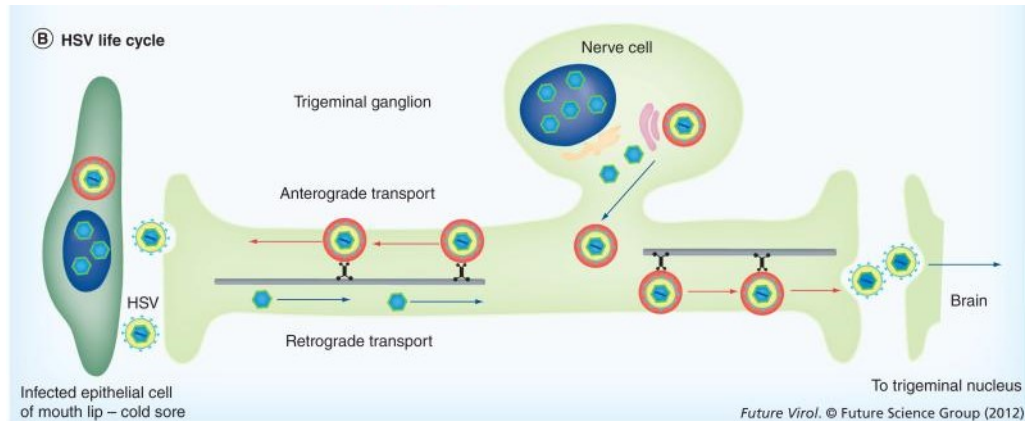


Figura 6: Ciclo di vita di HSV-1: processo che il virus segue per infettare il ganglio trigemino.¹⁴

2.1.6 Ruolo del sistema immunitario nell'infezione da HSV-1

I recettori Toll-Like (TLR) hanno dimostrato essere importanti mediatori delle risposte immunitarie innate nelle infezioni da HSV-1: sono recettori di membrana coinvolti nel riconoscimento di PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) che attivano la risposta infiammatoria dell'ospite e modulano la risposta immunitaria a valle. Più TLR sono coinvolti nella risposta a HSV-1, tra cui TLR2 e TLR9: il primo è un recettore di superficie, mentre il secondo interagisce con il DNA virale all'interno di endosomi cellulari. È stato dimostrato che HSV-1 attiva TLR2 *in vitro*: sia cellule isolate da topo che cellule umane rispondono al virus con produzione di citochine, IL-6 e IL-8 e questa produzione dipende da TLR-2. Inoltre, in topi TLR2 knockout si evidenzia una diminuita resistenza all'infezione da HSV-1, nonché una ridotta produzione di citochine locali e sistemiche. TLR9 invece è fondamentale nella risposta immunitaria a HSV-1 mediata da cellule dendritiche. L'infezione in topi TLR2 knockout o TLR9 knockout determina un elevato tasso di mortalità, ad indicare un ruolo importante di questi recettori nella risposta al virus; si ritiene che si verifichi la cooperazione *in vivo* tra TLR2 e TLR9 nell'induzione di una risposta dipendente da Myd88, una molecola adattatrice coinvolta nell'attivazione a valle del pathway di NFκB, con conseguente trascrizione di geni associati all'immunità innata.¹⁵

La risposta immunitaria cellulo-mediata è il più importante meccanismo di difesa immunitario contro l'infezione da HSV-1. Alterazioni della risposta immunitaria

mediata dalle cellule T, per lo più causate da immunosoppressione, sono di particolare rilevanza per la riattivazione di HSV-1.¹⁶ I linfociti T CD8 sono cruciali per controllare l'infezione da HSV-1 nei gangli sensoriali; queste cellule, che producono interferone- γ (IFN- γ), svolgono un ruolo importante nel prevenire la riattivazione dalla latenza nei neuroni sensoriali. Esperimenti con topi knockout IFN- γ (o recettore) supportano la sua importanza nel prevenire la riattivazione di HSV-1, attraverso l'inibizione della funzione della proteina virale precoce-immediata ICP0.⁴ Le cellule T CD8 si associano strettamente ai corpi delle cellule neuronali e monitorano l'espressione genica virale rilevando epitopi di proteine virali presentati sulla superficie del neurone tramite molecole MHC I (Major Histocompatibility Complex I). Le cellule T CD8 forzano quindi il genoma virale in uno stato quiescente attraverso la produzione di IFN- γ o attraverso il rilascio di granuli litici.¹⁷ Inoltre, il rilascio di Granzima B dalle cellule T CD8 aiuta a inibire la riattivazione del virus dalla latenza attraverso la scissione di ICP4 (gene precoce-immediato, essenziale per la trascrizione dei geni β).¹⁸ Se la funzione delle cellule T CD8 viene compromessa (ad esempio da ormoni legati allo stress), si formano glicoproteine virali e nucleocapsidi, si assemblano nuovi virioni che vengono trasportati dal trasporto assonale anterogrado e rilasciati ai siti muco-cutanei, portando potenzialmente a riattivazioni ricorrenti di HSV-1.¹⁷ Anche le cellule T CD4 hanno mostrato un ruolo importante sia come fonte di IFN- γ sia come effettori citotossici all'inizio del decorso dell'infezione, seguiti da un successivo reclutamento delle cellule T CD8. È stato dimostrato che IFN- γ secreto dalle cellule T CD4 ha ripristinato l'espressione di MHC I sulle cellule epiteliali infette, precedentemente bloccato da meccanismi di evasione di HSV-1, consentendo così il riconoscimento da parte di linfociti T CD8. Chemochine, IL-12 e IFN- α , - β e - γ prodotte sia dalle cellule epiteliali che dalle cellule immunitarie infiltrate all'interno delle lesioni erpetiche sono fondamentali per il controllo di questo virus; mentre le chemochine attirano monociti e cellule T nelle lesioni, IL-12 è coinvolta nell'attivazione di linfociti T CD8 citotossici, con conseguente eliminazione del virus dalle lesioni.⁴

2.1.7 Inibitori della replicazione di HSV-1

La maggior parte dei farmaci utilizzati nel trattamento dell'infezione da HSV-1 sono nucleosidi modificati o loro profarmaci. Il principale meccanismo d'azione si basa sull'inibizione dell'attività della HSV-DNA polimerasi, enzima chiave per la replicazione del virus.

Di seguito sono riportati i farmaci antierpetici clinicamente approvati:

- *5-iodo-2' deossiuridina*: nucleoside pirimidinico con struttura simile all'uridina, ma priva del gruppo 2'idrossile sulla porzione ribosio, sostituito da un atomo di idrogeno. Primo farmaco antivirale utilizzato per il trattamento della cheratite erpetica.¹⁹

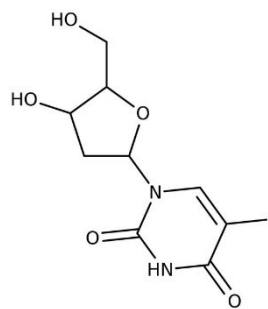


Figura 7: Struttura chimica di 5-iodo-2'-deossiuridina¹⁹

- *Aciclovir (ACV)*: analogo aciclico della guanosina, farmaco efficace e a bassa tossicità. Viene fosforilato da parte della timidina chinasi virale con successiva formazione del corrispondente monofosfato (ACVMP). Subisce due ulteriori fosforilazioni, catalizzate da chinasi cellulari, con formazione del trifosfato (ACVTP): agisce come substrato della DNA polimerasi virale e viene incorporato nella catena di DNA virale terminando la sua sintesi. Presenta tuttavia una scarsa biodisponibilità orale (10-30%), una solubilità limitata in acqua e una breve emivita nel sangue. Sono perciò necessarie dosi frequenti ed elevate che possono aumentarne la tossicità.¹⁹

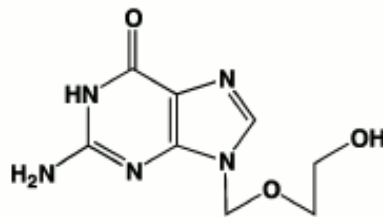


Figura 8: Struttura chimica di Aciclovir¹⁹

- *Valaciclovir*: estere L-valina dell'aciclovir, profarmaco efficace e sicuro. È aumentata la biodisponibilità orale grazie ad un rapido assorbimento intestinale attraverso il trasportatore di peptidi intestinali umani hPEPT1, seguito dalla conversione in Aciclovir mediante l'idrolisi dell'estere nell'intestino tenue.¹⁹

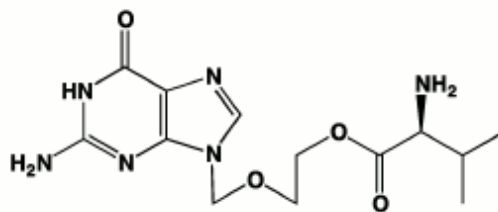


Figura 9: Struttura chimica di Valaciclovir¹⁹

- *Penciclovir*: analogo ciclico della guanosina, ampiamente usato per il trattamento delle lesioni cutanee indotte da HSV-1. È in grado di inibire la replicazione di un ceppo di HSV-1 che codifica per una DNA polimerasi mutante. Presenta però una bassa biodisponibilità orale.¹⁹

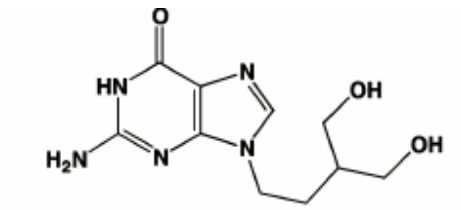


Figura 10: Struttura chimica di Penciclovir¹⁹

- Famciclovir: profarmaco di Penciclovir e suo derivato diacetilico; se somministrato per via orale, risulta essere più efficace di Aciclovir nell'eliminare il virus dai suoi siti bersaglio e ha inoltre la capacità di prevenire l'infezione latente di HSV-1.¹⁹

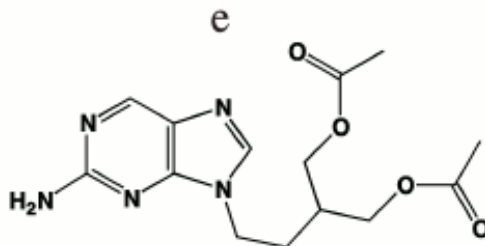


Figura 11: Struttura chimica di Famciclovir¹⁹

2.2 LA MALATTIA DI ALZHEIMER

La malattia di Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD) è una malattia neurodegenerativa infiammatoria caratterizzata da un progressivo e irreversibile declino delle capacità cognitive (memoria, ragionamento e linguaggio), anomalie comportamentali fino all'incapacità di svolgere attività della vita quotidiana.²⁰ L'AD è la principale causa di demenza degenerativa invalidante, con esordio prevalentemente in età presenile (65 anni).

2.2.1 Caratteristiche generali

Nel 1902 Alois Alzheimer descrisse per la prima volta le caratteristiche cliniche e patologiche di un'insolita malattia cerebrale, la malattia di Alzheimer, durante l'incontro della Society of Southwest German Psychiatrists a Tubinga: la sua prima paziente fu Auguste Deter che soffrì di perdita di memoria, disorientamento, allucinazioni e delusioni e morì all'età di 55 anni. Nel 1910, Emil Kraepelin chiamò la condizione con l'eponimo di "morbo di Alzheimer" (AD) che è, ora, la malattia neurodegenerativa più comune con oltre 25 milioni di casi in tutto il mondo.²¹ La malattia è strettamente associata a placche amiloidi costituite dalla proteina amiloide- β ($A\beta$) e grovigli neurofibrillari intraneuronali, composti dalla proteina tau iperfosforilata.²² È una malattia con esordio insidioso, caratterizzata dalla progressiva compromissione delle funzioni comportamentali e cognitive tra cui memoria, comprensione, linguaggio, attenzione, ragionamento e giudizio. L'esordio prima dei 65 anni di età (esordio precoce) è insolito e si osserva in meno del 10% dei pazienti con malattia di Alzheimer.²² Questa malattia originariamente indicava un disturbo ad esordio precoce (EOAD; <65 anni di età) e non includeva i pazienti più anziani con "demenza senile". In effetti, la prima paziente riportata con la neuropatologia dell'AD, Auguste Deter (1850-1906), sembrava presentare l'insorgenza dei sintomi già alla fine dei quarant'anni di vita, ben prima di essere diagnosticata con demenza all'età di 51 anni. I suoi sintomi includevano perdita di memoria, confusione, disturbi del linguaggio e comportamento imprevedibile, agitato, aggressivo e paranoico e, all'autopsia, furono riscontrati quelli che ora riconosciamo come i caratteristici marcatori neuropatologici dell'AD, placche neuritiche amiloidi-positivo extracellulari e grovigli neurofibrillari intracellulari tau-positivi (NFT). Con l'osservazione di una neuropatologia simile associata al declino cognitivo in tutte le fasce d'età, i ricercatori hanno successivamente ampliato la diagnosi di AD per includere l'AD ad insorgenza tardiva molto più comune (LOAD).²³ EOAD differisce da LOAD per vari aspetti: maggior ritardo nella diagnosi, minore incidenza di diabete, obesità, disturbi circolatori, maggior prevalenza di lesioni cerebrali traumatiche, maggiori problemi psicosociali, decorso più aggressivo, perdita di indipendenza,

depressione e ansia.²³

2.2.2 Dati epidemiologici

Un numero sostanzialmente maggiore di donne rispetto agli uomini presenta la malattia di Alzheimer in tutto il mondo (rapporto donne : uomini 2 : 1); tuttavia, se gli indicatori epidemiologici come prevalenza e incidenza siano influenzati dal sesso, è ancora oggetto di dibattito. L'analisi della prevalenza dell'AD per sesso (il numero di donne colpite dalla malattia diviso il totale di donne nella popolazione) rivela che la prevalenza di AD tra le donne è significativamente maggiore di quella tra gli uomini.²⁴ Queste differenze sono influenzate dalla regione geografica e dal tempo storico di analisi a causa dell'interazione di fattori sessuali e di genere con un ambiente fisico, culturale e sociale che cambia. I drammatici cambiamenti storici avvenuti nella seconda metà del secolo scorso hanno avuto un impatto diverso sulle donne rispetto agli uomini. Ad esempio, gli uomini entrarono in guerra nel 1939-1945, mentre le donne rimasero a casa con anziani e bambini e assunsero nuovi ruoli per sostenere gli sforzi bellici (molte donne iniziarono a lavorare nell'industria o nell'agricoltura).²⁵ Il *Center for Disease Control* ha stimato che il numero di persone di età superiore ai 65 anni aumenterà da 420 milioni a 1 miliardo dal 2000 al 2030. Poiché l'AD è una malattia che si manifesta principalmente in età presenile, può diventare un problema di difficile soluzione a livello globale. L'invecchiamento demografico è un processo mondiale che rappresenta i successi del miglioramento dell'assistenza sanitaria del secolo scorso. La maggior parte delle persone oggi vive una vita più lunga e più sana e quindi la popolazione mondiale ha una percentuale maggiore di persone anziane.²⁶ Attualmente ci sono oltre 55 milioni di persone nel mondo affette da demenza e la maggior parte dei casi sono correlati all'AD; questo numero raddoppierà quasi ogni vent'anni, raggiungendo i 78 milioni nel 2030 e i 139 milioni nel 2050.² La maggior parte delle persone affette da questa malattia vive nei paesi in via di sviluppo (60% nel 2001 e salirà al 71% entro il 2040). I tassi di aumento però non sono uniformi e le regioni possono essere divise in tre grandi gruppi:

- Le regioni sviluppate partono da una base elevata, ma subiranno un moderato aumento proporzionale (100% tra il 2001 e 2040).
- L'America Latina e l'Africa partono da una base bassa, ma sperimenteranno un rapido aumento dei numeri (235-393%). I paesi dell'America Latina oggi hanno la metà delle persone affette da demenza (1,8 milioni) rispetto al Nord America (3,4 milioni); tuttavia si stima che entro il 2040 i numeri saranno simili (9,1 milioni).
- India, Cina e paesi dell'Asia meridionale e del Pacifico occidentale partono da una base elevata e subiranno una rapida crescita dei casi (314-336%). Questo implica che entro il 2040 la Cina avrà tre volte più persone che vivono con demenza rispetto all'Europa Occidentale.

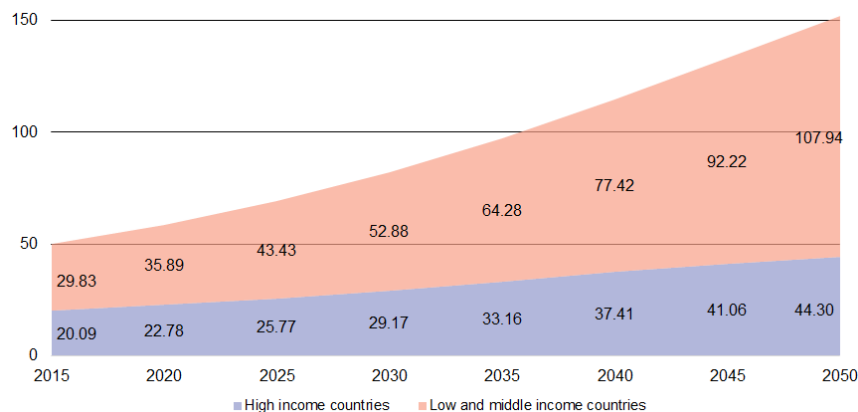


Figura 12: Numero di persone con demenza (milioni) nei paesi ad alto e medio reddito rispetto ai paesi a basso reddito²⁸

Secondo le stime del Global Burden of Disease per il World Health Report 2003, la demenza ha contribuito all'11,2% degli anni vissuti con disabilità nelle persone di età pari o superiore ai 60 anni; più dell'ictus (9,5%), dei disturbi muscolo-scheletrici (8,9%), delle malattie cardiovascolari (5,0%) e di tutte le forme di cancro (2,4%).²⁹ Il costo totale stimato a livello mondiale della demenza era di 818 miliardi di dollari nel 2015, che rappresentava l'1,09% del PIL globale. Il costo globale annuale è ora superiore a 1,3 trilioni di dollari e si prevede che salirà a 2,8 trilioni di dollari entro il 2050. Questa cifra include i costi attribuiti all'assistenza informale (assistenza non retribuita fornita dai familiari), i costi

diretti dell'assistenza sociale (fornita da professionisti dell'assistenza comunitaria) e i costi diretti dell'assistenza medica. I costi diretti delle cure mediche rappresentano circa il 20% dei costi globali della demenza, mentre i costi diretti del settore sociale e i costi dell'assistenza informale rappresentano ciascuno il 40%.²⁶

2.2.3 Caratteristiche cliniche di AD: sintomi e segni

Gli individui con AD manifestano cambiamenti variabili ma significativi e/o menomazioni da lievi a moderate a livello cognitivo, funzionale e comportamentale. Alcuni dei primi sintomi si manifestano anni prima di ricevere la diagnosi, compresi i cambiamenti di umore, ansia e sonno (ansia accentuata, sintomi depressivi e apatia sono prevalenti nella fase pre-clinica o precoce di AD); disorientamento, confusione, cambiamenti comportamentali come aggressività e agitazione, sintomi neuro-psichiatrici, come deliri e allucinazioni possono non essere riconosciuti fino alla diagnosi.³⁰ Solitamente i sintomi compaiono per la prima volta dopo l'età di 60 anni e vengono riportati in clinica da familiari quando osservano un progressivo declino della memoria a breve termine. Tra le principali caratteristiche cliniche sono incluse: la formulazione di domande ripetute, smarrimento di oggetti personali, disorientamento, compromissione della capacità linguistica, perdita di memoria (soprattutto per le informazioni apprese di recente), difficoltà di lettura, ansia, depressione, irritabilità, perdita di peso fino alla completa incapacità di svolgere attività della vita quotidiana.³¹ Il decorso della malattia è diviso in fasi, caratterizzate da un progressivo deterioramento cognitivo e funzionale:

- Fase pre-clinica: perdita della memoria episodica a breve termine, incapacità di acquisire nuove informazioni, incapacità di risolvere problemi, mancanza di motivazione, problemi di attenzione e di pianificare azioni. Questa fase è chiamata anche "Mild Cognitive Impairment" (MCI), ossia una fase di transizione tra l'invecchiamento fisiologico e la demenza.

- Fase iniziale: crescente compromissione dell'apprendimento e della memoria, disturbi del linguaggio, difficoltà nell'eseguire movimenti complessi.
- Fase intermedia: insorgenza di sintomi neuropsichiatrici come apatia, ritiro sociale, agitazione, psicosi, irritabilità; incapacità di svolgere attività quotidiane, compromissione della memoria a lungo termine.
- Fase finale: difficoltà a svolgere compiti motori appresi (disprassia), disfunzione olfattiva, disturbi del sonno, segni motori extrapiramidali come distonia e sintomi parkinsoniani, perdita della parola, apatia, incontinenza e incapacità di nutrirsi.²²

2.2.4 Fisiopatologia della malattia di Alzheimer

Anche se con oltre cent'anni di storia, per la malattia di Alzheimer non è ancora completamente chiara la sua patogenesi e una possibile terapia che induca una guarigione. Sono però note alcune caratteristiche microscopiche e macroscopiche che possono aiutare nella caratterizzazione e comprensione della patogenesi.

2.2.4.1 Caratteristiche macroscopiche

Anche se con oltre cent'anni di storia, per la malattia di Alzheimer non è ancora completamente chiara la sua patogenesi e una possibile terapia che induca una guarigione naturale. Sono però note alcune caratteristiche microscopiche e macroscopiche che possono aiutare nella sua comprensione, caratterizzazione e patogenesi. A livello macroscopico si può osservare atrofia dell'ippocampo e della corteccia cerebrale.³² L'ippocampo è una struttura omogena del lobo temporale mediale, coinvolto nella memoria episodica (capacità di ricordare episodi specifici del proprio passato) e nella consapevolezza spaziale, e la sua atrofia nel lobo temporale, mediale e basale è stata inclusa come biomarcatore per il processo fisiopatologico della malattia di Alzheimer. I primi sintomi di atrofia dell'ippocampo possono includere la difficoltà di ricordare eventi del passato

recente, il disorientamento e la tendenza a perdersi anche in ambienti familiari.³³

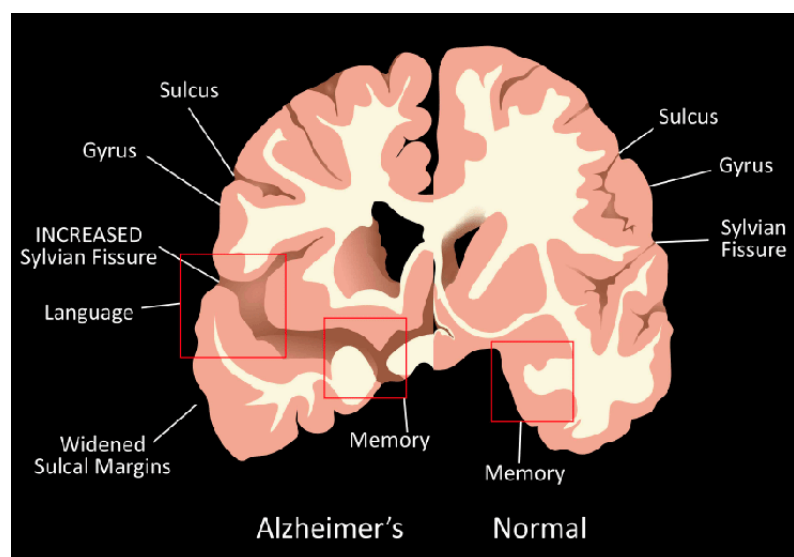


Figura 13: Alterazioni macroscopiche della fisiopatologia dell'Alzheimer³⁴

2.2.4.2 Caratteristiche microscopiche

A livello microscopico, la malattia di Alzheimer è caratterizzata dalla presenza di due segni distintivi localizzati principalmente nell'ippocampo e nella corteccia: placche amiloidi extracellulari composte da aggregati insolubili della proteina amiloide- β ($A\beta$) e grovigli neurofibrillari intraneuronali, composti dalla proteina tau iper-fosforilata. Il peptide beta-amiloide ($A\beta$) è un aggregato di proteine con morfologia fibrillare di 7-13 nm di diametro, con una struttura secondaria a foglietti β (β -sheet) e deriva da una glicoproteina transmembrana, nota come proteina precursore dell'amiloide (APP).³⁵I grovigli neurofibrillari consistono in un fascio di strutture filiformi chiamate microtubuli aggrovigliate a proteine note come proteine tau.

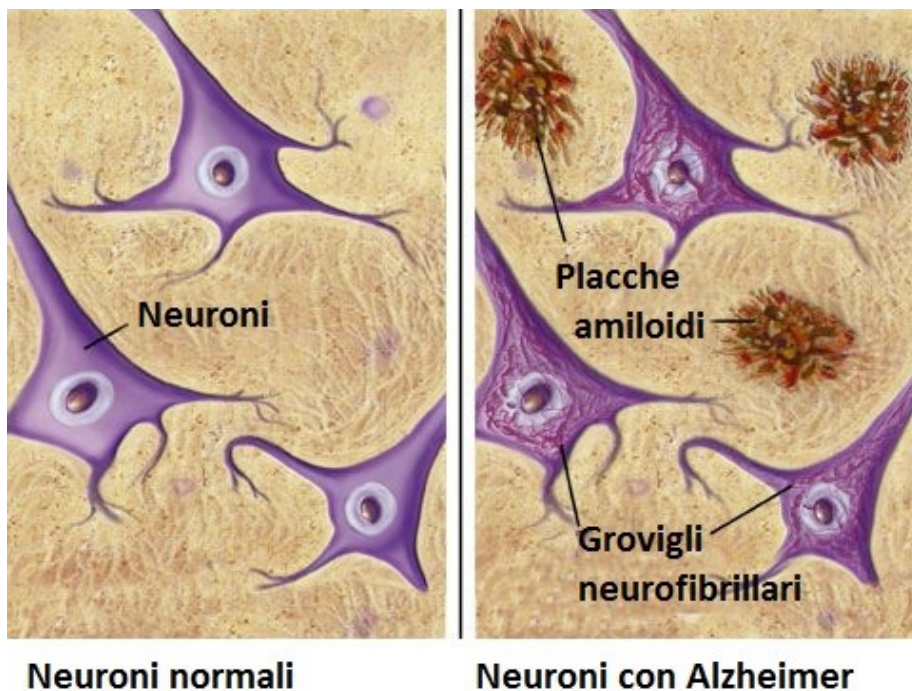


Figura 14: Confronto tra neuroni in condizioni fisiologiche e neuroni in presenza della patologia di Alzheimer: rappresentazione delle alterazioni microscopiche, le placche amiloidi e i grovigli neurofibrillari³⁶

2.2.4.3 APP: Amyloid Precursor Protein

L'APP è una proteina transmembrana costituita da 770 amminoacidi, nota per essere il precursore della beta amiloide, proteina coinvolta nell'eziopatologia dell'Alzheimer. Il gene APP si trova sul cromosoma 21 e possiede tre isoforme principali derivanti da splicing alternativo: APP695, APP751 e APP770. In particolare, APP695 è espressa prevalentemente nei neuroni. Sebbene l'APP sia stato oggetto di molti studi sin dalla sua identificazione, la sua funzione fisiologica rimane ancora in gran parte indeterminata. Svolge un ruolo nella crescita e nella sinaptogenesi di neuriti, nel traffico di proteine neuronali lungo l'assone, nella trasduzione di segnali transmembrana, nell'adesione cellulare e nel metabolismo del calcio.³⁷

L'APP può essere processato attraverso due vie pathway molecolari alternativi: la via non amiloidogena e la via amiloidogena. Nella via non amiloidogena, l'APP viene scisso dagli enzimi α -secretasi e γ -secretasi. L'enzima α -secretasi

taglia l'APP ad 83 amminoacidi dal dominio C-terminale, producendo così un dominio N-terminale di grandi dimensioni, solubile, chiamato sAPP α . Sul lato opposto, il frammento C-terminale di 83 amminoacidi (C83) viene scisso dal complesso della γ -secretasi (un complesso proteasico etero-tetramericco costituito dalle proteine presenilina, nicastrina, anterior pharynx-defective 1 e presenilin enhancer 2), che produce un piccolo peptide non tossico, noto come p3: il taglio proteolitico di APP da parte di questo complesso determina il rilascio nel citoplasma di un frammento noto come "intracellular C-terminal domain (AICD)".³⁸

A differenza di A β , sAPP α ha un ruolo importante nella plasticità/sopravvivenza neuronale, è protettivo contro l'eccitotossicità (fenomeno di tossicità neuronale conseguente all'esposizione a concentrazioni relativamente alte di acido glutammico, 50-100 μ M), regola la proliferazione delle cellule staminali neuronali ed è importante per lo sviluppo precoce del SNC.³⁹

La via amiloidogena, invece, prevede la scissione di APP ad opera dell'enzima β -secretasi, chiamato anche BACE-1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) con formazione di due specie molecolari: la porzione N-terminale extracellulare solubile (sAPP β) e un frammento C-terminale legato alla membrana di 99 amminoacidi (CT99).⁴⁰ Sebbene sAPP β differisca da sAPP α solo per la mancanza della regione A β 1-16 al suo terminale carbossilico, sAPP β funziona come ligando del recettore di morte cellulare e media la morte di cellule neuronali.⁴⁰ Il frammento di 99 amminoacidi invece, viene scisso ulteriormente dalla γ -secretasi con produzione di A β , che viene rilasciato nello spazio extracellulare, e di AICD. I residui amminoacidici del dominio C-terminale di A β sono idrofobici e conferiscono al peptide la capacità di auto-aggregarsi e polimerizzare in fibrille amiloidi. A seconda del punto esatto di scissione da parte della γ -secretasi, vengono prodotte 3 principali forme di A β , comprendenti rispettivamente 39, 40 e 42 residui amminoacidici. In particolare, la quantità di A β 42 è importante perché più incline a oligomerizzare e formare fibrille amiloidi.⁴¹

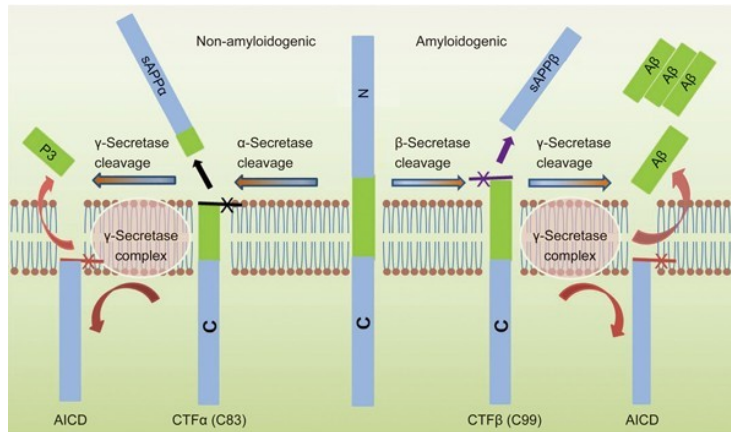


Figura 15: Rappresentazione grafica dei due pathway molecolari di scissione dell'APP: la via amiloidogena e la via non amiloidogena ⁴⁰

Essendo discriminante la secretasi che per prima innesca il taglio proteolitico, l'azione dell' α -secretasi impedisce la formazione di $A\beta$. Sia nella via amiloidogena che nella via non amiloidogena, dal lato C-terminale dell'APP, la γ -secretasi genera anche il dominio intracellulare AICD il quale modula la trascrizione di diversi geni (APP stesso, BACE-1 e l'enzima neprilisina, coinvolto nella degradazione di $A\beta$), regola l'apoptosi e contribuisce alla patogenesi di AD.⁴² APP contiene inoltre otto siti di fosforilazione all'interno del suo dominio citoplasmatico. In particolare, la fosforilazione costitutiva di APP a livello dell'amminoacido Treonina 668 (Thr668) è stata osservata specificatamente nel cervello e svolge un ruolo nel metabolismo dell'APP facilitando la scissione da parte di BACE e un conseguente aumento nella produzione di $A\beta$.⁴³ Anche AICD può essere fosforilato a livello di Thr668: in questa forma interagisce con la proteina adattatrice Fe65, entra nel nucleo dove può regolare la trascrizione genica e indurre neurodegenerazione.⁴³ La via amiloidogena viene innescata a livello della membrana cellulare, nel reticolo endoplasmatico, nel Golgi e nel sistema endosomiale/lisosomiale: questo comporta il rilascio di $A\beta$ nello spazio extracellulare e, in seguito alla sua aggregazione, favorisce la formazione di placche senili. In alternativa può rimanere all'interno della cellula o essere re-internalizzato nei neuroni dove si accumula sotto forma di piccoli oligomeri. Questi ultimi sono la principale causa del danno sinaptico che è correlato con i

deficit cognitivi.

2.2.4.4 β -Amiloide ($A\beta$)

$A\beta$ è una piccola proteina composta da 40-43 amminoacidi, generata dalla scissione proteolitica di APP da parte degli enzimi β -secretasi e γ -secretasi. La produzione e la secrezione di $A\beta$ sono stimulate dall'attività sinaptica; pertanto la sua generazione non è intrinsecamente tossica. Infatti il peptide $A\beta$ svolge importanti funzioni fisiologiche:

- Attività antimicrobica: $A\beta$ agisce come chelante generale di agenti tossici (ioni metallici, batteri, virus, proteine e molecole neuroattive) che vengono disciolti nel fluido extracellulare. Una volta legati, gli agenti patogeni vengono fagocitati ed eliminati da microglia e macrofagi.⁴⁴
- Soppressione del tumore a livello cerebrale: $A\beta$ può intercettare i virus oncogeni, inibire la crescita delle cellule tumorali e sopprimere la crescita del tumore ritardando la neo-vascolarizzazione. Ha inoltre la capacità di legare ferro, rame e zinco diminuendo così la disponibilità di questi micronutrienti essenziali per la proliferazione delle cellule tumorali.⁴⁴
- Sigilla le perdite della barriera emato-encefalica: lesioni cerebrali traumatiche stimolano la produzione di $A\beta$ che si lega ai globuli rossi, alle proteine del sangue, agli ioni ferro e rame. Queste interazioni fanno sì che $A\beta$ aggregi nel sito di emorragia o nelle membrane cellulari, aumentando così l'aderenza tra i globuli rossi e le cellule endoteliali vascolari, contribuendo a sigillare le perdite nella vascolarizzazione.⁴⁴
- A concentrazioni picomolari migliora la plasticità sinaptica, l'apprendimento e la memoria.
- Riduce l'attività eccitatoria dei canali del potassio e riduce l'apoptosi neuronale.⁴⁵

Si può quindi affermare che, basse concentrazioni (picomolari) di $A\beta$ (considerate fisiologiche), hanno un ruolo positivo nella neurotrasmissione e nella memoria;

mentre alte concentrazioni comportano la perdita di funzioni sinaptiche con conseguente induzione di neurodegenerazione.

Il problema insorge quando i peptidi A β si uniscono in fibrille insolubili con struttura a foglietto β , le placche amiloidi, che rappresentano una lesione patologica anormale e sono il segno distintivo neuropatologico dell'AD.⁴⁶

Esistono diverse specie di peptidi A β : quelli composti da 40 e 42 amminoacidi (A β ₄₀ e A β ₄₂) sono i più abbondanti nel cervello. Vengono rilasciati inizialmente come monomeri e si aggregano progressivamente in dimeri, trimeri, oligomeri e fibrille fino alla formazione di placche amiloidi. In particolare, A β ₄₂ è il più incline all'aggregazione e quindi è considerato il più tossico. Interagisce con i neuroni e le cellule gliali portando all'attivazione di cascate infiammatorie, stress ossidativo, alterazione del metabolismo del calcio, fosforilazione di Tau e induzione dell'apoptosi neuronale.⁴⁷ Il peptide A β è un agente neurotossico che porta alla morte cellulare neuronale e alla perdita di memoria; può inoltre legarsi a numerose molecole nello spazio extracellulare, compresi i recettori della superficie cellulare, i metalli e le membrane cellulari. Infine il peptide A β promuove la depolarizzazione della membrana sinaptica con conseguente eccessivo afflusso di calcio e danno mitocondriale, compromettendo così la capacità delle cellule di mantenere uno stato fisiologico. L'aggregazione di A β porta alla produzione di radicali liberi come ROS (Reactive Oxygen Species), che reagiscono con proteine e lipidi, con conseguente formazione di proteine ossidate tossiche e lipidi perossidati. Le proteine ossidate sono dannose per l'integrità delle membrane, mentre i lipidi perossidati possono generare prodotti tossici come 4-idrossi-2-nonenale (HNE) e 2-propenina (acroleina) che alterano l'attività cellulare dei neuroni. Infine, lo stress ossidativo indotto dall'aggregazione di A β causa ossidazione e quindi danni al DNA che si manifestano con aumento delle mutazioni geniche, le quali possono essere alla base dei meccanismi di insorgenza del cancro e dell'invecchiamento cellulare.⁴⁷ L'aumento dei livelli di A β e la sua aggregazione continua promuovono una risposta cronica del sistema immunitario attivando la microglia, che può portare alla perdita neuronale attraverso la fagocitosi diretta. I recettori immunologici coinvolti includono il recettore Toll-like (TLR2, TLR4, TLR9) e i loro co-recettori (CD14, CD36 e CD47). Questi

recettori sono in grado di assorbire la proteina beta-amiloide prima che abbia la possibilità di aggregarsi. L'aggregazione di A β provoca anche risposte infiammatorie e il rilascio di mediatori dell'infiammazione come eicosanoidi, chemochine (TNF- α), citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL-6 e IFN- γ) e fattori del complemento, che possono portare ad un aumento della morte neuronale, perdita di sinapsi e riduzione della clearance di A β e dei detriti neuronali.⁴⁸

2.2.4.5 La proteina tau

La malattia di Alzheimer è caratterizzata, oltre che dalla formazione di placche amiloidi, anche da grovigli neurofibrillari intraneuronali, composti dalla proteina tau iperfosforilata. Tau è la principale proteina associata ai microtubuli (Microtubule Associated Protein, MAP) di un neurone maturo, e si trova principalmente negli assoni. È presente in sei isoforme molecolari diverse, codificate da un singolo gene localizzato sul cromosoma 17 e generate da splicing alternativo. Tau è una proteina altamente solubile che interagisce con la tubulina e ne promuove l'assemblaggio in microtubuli stabilizzando la loro struttura.⁴⁹

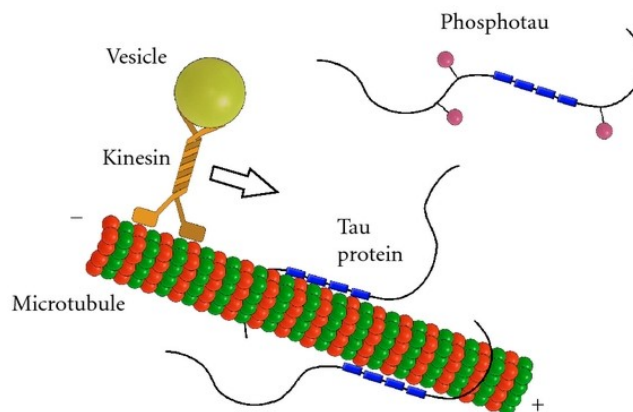


Figura 16: Funzione fisiologica della proteina tau che stabilizza i microtubuli interagendo con la tubulina (quadrati blu)⁵⁰

Ha più di 45 siti di fosforilazione, la maggior parte dei quali si trova nella regione ricca di prolina (regione P, residui 172-251) e nella regione C-terminale (regione

C, residui 368-44).⁵¹ Tau cerebrale normalmente contiene 2-3 moli di fosfato per mole di proteina e in condizioni fisiologiche è presente nel cervello ad una concentrazione di 2 μ M. La fosforilazione di tau da parte di chinasi (PKN, una serina / treonina chinasi) è bilanciata dalla de-fosforilazione da parte di fosfatasi, permettendo così di mantenere l'equilibrio necessario per il legame della proteina ai microtubuli. ⁵² Nella malattia di Alzheimer questa proteina risulta essere iper-fosforilata (9 moli di fosfato per mole di proteina) a causa di una diminuzione dell'attività della fosfatasi 2A (PP-2A). In questa forma non si lega alla tubulina, ne inibisce l'assemblaggio in microtubuli e si aggrega in grovigli neurofibrillari (Neurofibrillary Tangles, NFT).⁵³ Come detto precedentemente, la principale funzione di tau è la stabilizzazione dei microtubuli, elementi del citoscheletro cellulare, responsabili dei sistemi di trasporto assonale (facilitato da proteine motorie come la chinesina e la dineina) , e che assicurano il trasporto di costituenti cellulari come organelli e molecole di segnalazione essenziali. Prima della formazione di NFT, l'iper-fosforilazione all'estremità C-terminale di tau induce l'autoassemblaggio della proteina che porta alla formazione di filamenti elicoidale accoppiati (Paired Helical Filament, PHF).⁵⁴ Questa conformazione inibisce il trasporto assonale e destabilizza i microtubuli. Rispetto ai soggetti sani, i pazienti con AD possiedono una quantità quattro volte maggiore di proteina tau iper-fosforilata. Inoltre, le proteine tau mal ripiegate perdono la loro funzione primaria di stabilità dei microtubuli e risultano essere neurotossiche. In definitiva, il funzionamento di tau-microtubuli è compromesso causando la mancanza di un corretto trasporto assonale, con conseguenti deficit funzionali responsabili, tra l'altro, delle insufficienze cognitive.⁵⁴

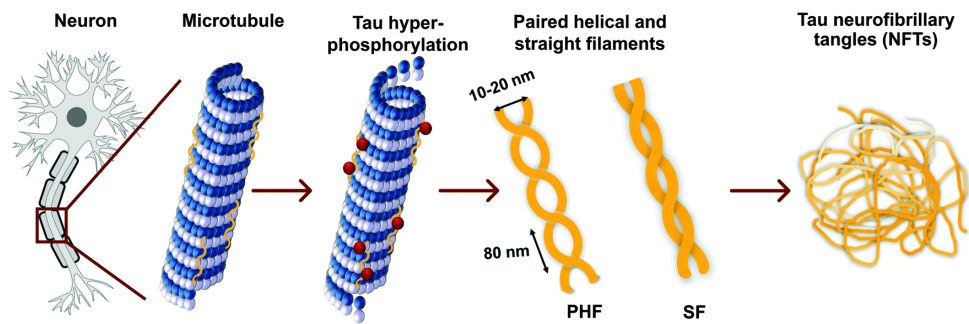


Figura 17: L'iper-fosforilazione di tau porta alla formazione di filamenti elicoidali accoppiati con conseguente NFT⁵⁵

2.2.5 Fattori di rischio della malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer è una complessa malattia multifattoriale attribuibile all'interazione tra cause genetiche e fattori ambientali:

- Il 70% del rischio di sviluppare AD è attribuito alla genetica: si possono verificare mutazioni nei geni APP (proteina precursore della β -amiloide), PSEN1 e PSEN2 (presenilina 1 e presenilina 2, componenti del complesso proteolitico della γ -secretasi) e polimorfismi nel gene APOE (gene apolipoproteina E), in particolare la presenza di allele $\epsilon 4$.⁵⁶ La maggior parte delle mutazioni di APP e PSEN1 portano ad un aumento del rapporto $A\beta_{42}$: $A\beta_{40}$ favorendo la deposizione precoce di $A\beta$ nel tessuto cerebrale con conseguente attivazione della cascata amiloidogenica. L'apolipoproteinaE (APOE) è una proteina coinvolta nel metabolismo lipidico, codificata dal gene APOE, situato sul cromosoma 19. È in grado di legarsi al peptide $A\beta$, promuovendo la sua polimerizzazione in fibrille e la sua deposizione nel tessuto cerebrale; inoltre i frammenti di APOE generati dall'attività di proteasi hanno effetti tossici che possono portare a lesioni neuronali.⁵⁶
- L'età è uno dei fattori di rischio più importanti per il declino cognitivo: con l'avanzare dell'età, la prevalenza di AD aumenta al 19% negli individui di età compresa tra 75 e 84 anni, e al 30-35% per quelli di età superiore a 85 anni. Si può quindi affermare che l'AD può essere una

forma accelerata di invecchiamento in quanto molti cambiamenti patologici caratteristici della malattia sono simili, tranne che per la loro gravità, a quelli presenti nell'invecchiamento fisiologico.⁵⁷

- Malattie cerebro-vascolari: tra il 6% e il 47% degli individui con AD ha un'insorgenza simultanea di malattia cerebrovascolare (infarti emorragici, infarti corticali ischemici, vasculopatie). Questi eventi portano alla disfunzione della barriera emato-encefalica, all'accumulo di molecole neurotossiche, alla riduzione del flusso cerebrale con conseguenti danni neuronali. Nella via amiloidogena, il danno vascolare porta ad un aumento dell'espressione e dell'elaborazione di APP, con aumento del peptide A β .
- L'ipertensione è in grado di aumentare il rischio di sviluppare AD; in particolare, influisce negativamente sulle prestazioni cognitive in età più avanzata. Causa variazioni della parete vascolare che possono portare a ipo-perfusione, ischemia e ipossia cerebrale. L'ischemia cerebrale causa un accumulo di APP e A β , oltre a indurre l'espressione di presenilina, coinvolta nella produzione di A β .⁵⁸
- Diabete di tipo 2: la carenza o la resistenza all'insulina sono in grado di stimolare l'azione delle β e γ -secretasi, di ridurre la clearance di A β portando così al suo accumulo nel tessuto cerebrale e di indurre l'iperfosforilazione di Tau con conseguente formazione di grovigli neurofibrillari.⁵⁸
- Dislipidemia: elevati livelli di colesterolo circolante compromettono l'integrità della barriera emato-encefalica e sono associati ad un aumento della deposizione di A β , della formazione di NFT, declino cognitivo, neuro-infiammazione e disfunzione neuronale.⁵⁸
- Fumo: è in grado di generare radicali liberi che aumentano lo stress ossidativo e di promuovere l'azione pro – infiammatoria nel sistema immunitario, portando all'attivazione dei fagociti e, di conseguenza, ad un

ulteriore danno ossidativo. Inoltre, il fumo può portare a malattie cerebrovascolari, che aumentano il rischio di sviluppare AD.⁵⁸

- **Ipotesi infettiva:** le variazioni osservate nella malattia di Alzheimer (come infiammazione, atrofia neuronale, amiloidogenesi, alterazione dell'espressione genica, deficit cognitivi) possono essere la conseguenza di un'infezione microbica. L'infezione diretta ed eventualmente la morte di cellule neuronali potrebbe spiegare i deficit cognitivi e l'aumento dell'infiammazione ritrovati in pazienti affetti dalla patologia.⁵⁹ Alcuni agenti patogeni come il virus dell'Herpes si trovano più comunemente nei pazienti con AD. Il virus dell'Herpes è un virus che stabilizza, inizialmente, un'infezione a livello delle cellule muco-epiteliali orali, per poi diffondere tramite trasporto retrogrado al corpo cellulare dei neuroni sensoriali situati nel ganglio trigemino per stabilire un'infezione latente che dura tutta la vita.⁶⁰ L'HSV-1 latente nel ganglio trigemino può riattivarsi e risalire le fibre nervose nelle aree limbiche del cervello (ippocampo, i lobi temporali e frontali) provocando danni locali ai neuroni.⁶¹

2.2.6 Terapia farmacologica

Anche se non esiste ancora una terapia risolutiva, sono state proposte diverse strategie terapeutiche per tentare di influenzare clinicamente e migliorare il decorso di AD. Non è ancora disponibile un trattamento causale, consistente cioè nella rimozione della causa, ma soltanto farmaci sintomatici, cioè finalizzati all'attenuazione delle manifestazioni cliniche della malattia:

- **Inibitori delle colinesterasi (Donepezil, Galantamina e Rivastigmina):** nei pazienti affetti da AD si riscontra una riduzione cerebrale di Acetilcolina (Ach), neurotrasmettitore importante per la memoria e il pensiero. Questi farmaci inibiscono l'attività dell'Acetilcolinesterasi (AChE), enzima responsabile della degradazione dell'Ach nelle sinapsi contribuendo così a

tenere elevati i livelli Ach nel cervello. Sono farmaci che legano l'AchE con un'affinità maggiore dell'acetilcolina, ma non reagiscono con l'enzima; impediscono solamente l'attacco di Ach all'enzima e ne prevengono l'idrolisi.⁶²

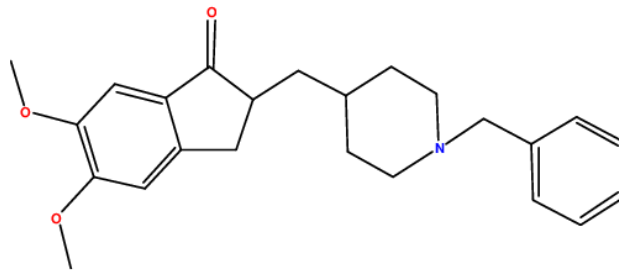


Figura 18: Struttura chimica di Donepezil: farmaco della famiglia delle N-benzilpiperidine; inibitore non competitivo, specifico e reversibile di AchE. Non presenta effetti avversi e migliora i sintomi dell'AD.

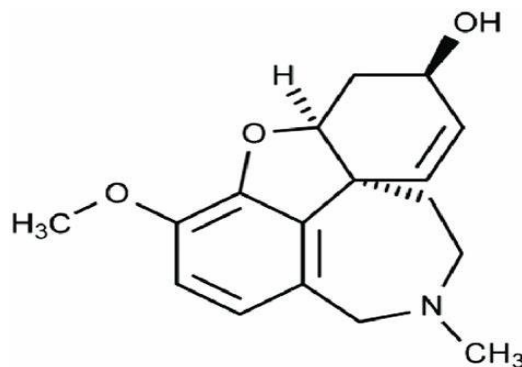


Figura 19: Struttura chimica di Galantamina: alcaloide terziario estratto da varie specie di Amaryllidaceae; inibitore selettivo, competitivo e reversibile di AchE.

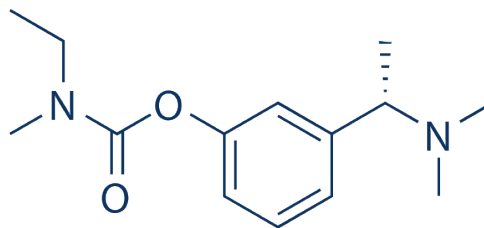


Figura 20: Struttura chimica di Rivastigmina : inibitore irreversibile pseudo-selettivo di AchE; facilita la neurotrasmissione colinergica rallentando l'inattivazione dell'Ach rilasciata dai neuroni colinergici.

- Antagonisti N-metil-D-aspartato (NMDA) (Memantina): è un recettore NMDA non competitivo che riduce l'eccessiva neurotrasmissione glutamaergica, diminuisce l'iperfosforilazione di Tau e protegge dalla tossicità indotta dal peptide A β .⁶²
- Inibitori di secretasi (2,2',4'-triidrossicalcone): farmaci che bloccano l'attività degli enzimi, soprattutto β e γ -secretasi, prevenendo così la formazione di A β .⁶²
- Terapia complementare: farmaci antiinfiammatori (Indometacina, Ibuprofene) riducono la formazione di A β e la risposta infiammatoria nel tessuto cerebrale; il composto 4'-Ometilhonokio (MH) ha dimostrato un'importante capacità inibitoria sull'induzione dell'amiloidogenesi e

sull'attivazione degli astrociti nel tessuto cerebrale. Queste attività favoriscono l'inibizione dei processi infiammatori associati alla fisiologia dell'AD e la riduzione delle conseguenze deleterie della malattia.⁶²

- Aducanumab: anticorpo monoclonale approvato dalla FDA nel 2021, che ha la capacità di legarsi alla beta amiloide, responsabile della formazione delle placche nel cervello dei pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer. Colpisce selettivamente forme aggregate di A β , inclusi oligomeri solubili e fibrille insolubili e riduce le placche A β , rallentando il declino clinico nei pazienti con AD prodromico o lieve, con sicurezza e tollerabilità accettabili.⁶³

2.3 RELAZIONE TRA HSV-1 E ALZHEIMER

2.3.1 L'ipotesi infettiva

L'ipotesi infettiva alla base dell'insorgenza del morbo di Alzheimer, suggerisce che un agente patogeno (virus o batterio) possa essere un fattore di rischio per lo sviluppo della malattia; quest'ipotesi è supportata dall'evidenza che alcuni agenti patogeni, come il virus dell'Herpes simplex, si trovano più comunemente nei pazienti con AD, specialmente nei portatori dell'allele di tipo 4 del gene dell'apolipoproteina E (ApoE-ε4).⁶⁴ Oltre ad HSV-1, altri patogeni che possono essere associati alla malattia di Alzheimer sono: Cytomegalovirus e altri Herpesviridae, Chlamydia pneumoniae, spirochete, Helicobacter pylori. Questi agenti patogeni sono in grado di eludere la distruzione da parte del sistema immunitario dell'ospite, portando a infezioni persistenti. Il DNA batterico e virale e l'RNA e i ligandi batterici aumentano l'espressione delle molecole pro-infiammatorie e attivano il sistema immunitario innato e adattativo.⁶⁵

Storicamente i primi lavori che hanno proposto l'ipotesi infettiva sono stati i seguenti:

- Nel 1982 Melvin Ball ipotizzò che HSV-1 fosse una causa di insorgenza della malattia di Alzheimer. Egli propose che l'HSV-1 latente situato nei gangli del trigemino potesse riattivarsi e risalire lungo le vie nervose conosciute nel sistema limbico e nelle aree del cervello più colpite nell'AD. L'encefalite da Herpes simplex e l'AD colpiscono le stesse regioni del cervello, inclusi i lobi frontali, i lobi temporali e l'ippocampo. I sopravvissuti all'encefalite da HSV-1 mostrano un declino cognitivo della memoria e del comportamento.⁶⁵
- La presenza del DNA di HSV-1 nel cervello è stata riportata in diversi studi epidemiologici. Infatti, dopo la prima osservazione di Ball et al. (1982), metodi di reazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzati da Jamieson et al. per rilevare il DNA di HSV-1 nei campioni cerebrali autopsici, ha confermato che l'HSV-1 latente è presente in un'alta

percentuale (70-100%) nel cervello di pazienti con AD, in particolare a livello delle placche amiloidi.³⁰

- Il DNA virale è assente nel cervello delle persone più giovani, suggerendo che il virus raggiunge il cervello all'avanzare dell'età in corrispondenza dell'indebolimento del sistema immunitario.⁶⁵

L'infezione diretta ed eventualmente la morte di cellule neuronali potrebbe spiegare i deficit cognitivi e l'aumento dell'infiammazione ritrovati in pazienti affetti da tale patologia. L'infiammazione causa danni ai tessuti cerebrali, la formazione di aggregati proteici come le placche amiloidi, che a loro volta possono portare ad un aumento dell'infiammazione. Inoltre A β e Tau, i principali marcatori di AD, possono essere prodotti in risposta ad infezioni; in seguito si può verificare un accumulo di tali proteine, quando l'aumentata produzione supera la capacità di clearance della microglia.⁶⁷

2.3.2 Dati epidemiologici

L'ipotesi infettiva della malattia di Alzheimer propone che il virus HSV-1 nel cervello dei portatori del gene ApolipoproteinaE rappresenti circa il 60 % dei casi e la maggior parte della popolazione è infettata all'età di 70 anni.⁶⁸ Studi epidemiologici mostrano un'associazione tra carico infettivo virale (IB) e declino cognitivo. L'IB è definito come una misura sierologica composta dell'esposizione a patogeni comuni.⁶⁵ Letenneur et al. hanno studiato il rischio di sviluppare AD in base alla presenza o all'assenza di anticorpi sierici anti-HSV-1, IgG e IgM, seguendo 512 pazienti anziani inizialmente privi di demenza, per 14 anni. La presenza di anticorpi anti-HSV IgM è associata a infezione primaria o recente riattivazione di HSV-1. Al contrario, la presenza di anticorpi anti-HSV IgG indica un'infezione da HSV-1 per tutta la vita.⁶⁹ I soggetti che erano IgM-positivi al basale hanno mostrato un rischio significativamente più elevato di sviluppare AD; pertanto, la riattivazione di HSV-1, come indicato dalla presenza di anticorpi anti-HSV IgM, è altamente correlata con l'AD.⁶⁵

Per valutare l'associazione tra HSV-1 e AD e gli effetti dei farmaci antierpetici sul rischio coinvolto, è stato eseguito uno studio retrospettivo da Tzeng et al.

utilizzando il National Health Insurance Research Database (NHIRD) di Taiwan. In questo studio sono stati arruolati 33448 soggetti di età superiore a 50 anni: sono stati identificati 8362 con infezione da HSV-1 e 25086 controlli casuali di sesso e età, senza infezione da HSV-1, in rapporto 1:3. L'analisi ha rilevato un Hazard Ratio (HR) di 2,564 (IC 95%, $P < 0,001$) per lo sviluppo di AD nella corte infetta da HSV-1 rispetto al gruppo controllo. Pertanto, i pazienti con infezione da HSV-1 possono avere un rischio aumentato di 2,564 volte di sviluppare AD. È stato ritrovato inoltre una riduzione del rischio di sviluppare AD nei pazienti affetti da HSV-1 che sono in terapia con farmaci antierpetici (Aciclovir, Valaciclovir): l'HR era 0,092. Questo significa che il trattamento con farmaci antierpetici può ridurre quasi del 90 % il rischio di sviluppare AD. Un trattamento della durata maggiore di 30 giorni è associata ad un rischio inferiore di disturbi neurodegenerativi rispetto ad un trattamento della durata minore di 30 giorni.⁷⁰

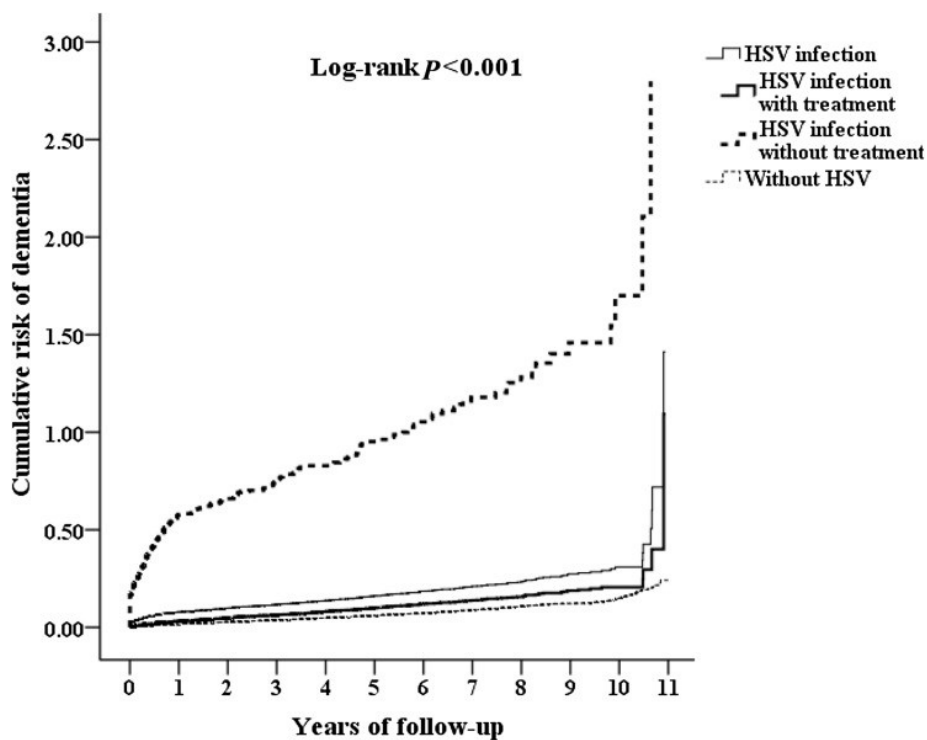


Figura 21: *Rischio cumulativo di demenza tra soggetti di età pari o superiore ai 50 anni senza infezione da HSV-1, con infezione da HSV-1, infetti e sottoposti a trattamento con farmaci antierpetici e infetti e non sottoposti a trattamento farmacologico⁷⁰*

2.3.3 Meccanismi molecolari di HSV-1

Il virus dell'Herpes simplex di tipo 1 è un virus neurotropico che instaura, inizialmente, un'infezione a livello delle cellule muco-epiteliali orali, per poi diffondere tramite trasporto retrogrado al corpo cellulare dei neuroni sensoriali situati nel ganglio trigemino per stabilire un'infezione latente che dura tutta la vita.⁷¹ Durante lo stato di latenza, il genoma virale è funzionalmente presente ma non vengono prodotte particelle infettive. In caso di stress, immunodepressione, danni fisici e cambiamenti ormonali il virus si riattiva dando origine alle vesciche sulla mucosa oro-labiale (herpes labiale). Dopo la riattivazione, HSV-1 può anche raggiungere il sistema nervoso centrale (SNC) con possibile conseguente grave, ma rara, forma di encefalite erpetica (Herpes Simplex Encephalitis, HSE). Numerosi studi suggeriscono anche un possibile legame tra l'infezione da HSV-1 e la malattia di Alzheimer⁷²: l'HSV-1 latente nel ganglio trigemino può riattivarsi e risalire le fibre nervose nelle aree limbiche del cervello (ippocampo, i lobi temporali e frontali) provocando danni locali ai neuroni. Le prove provenienti da studi sugli animali supportano anche l'ingresso di HSV-1 nel cervello attraverso il bulbo olfattivo, con il virus che sale lungo le vie nervose nelle strutture del sistema limbico, tra cui l'ippocampo, regione significativamente colpita nell'AD. Nell'ippocampo si verifica infatti una maggiore espressione dei recettori per le glicoproteine HSV-1 gD e gB.⁷³ Inoltre, le ripetute riattivazioni virali in modelli sperimentali innescano un progressivo accumulo di biomarcatori molecolari dell'AD nella corteccia e nell'ippocampo e sono correlate a deficit cognitivi crescenti, diventando irreversibili dopo sette cicli di riattivazione.⁷⁴

2.3.3.1 Effetti di HSV-1 sulla formazione di A β

Come spiegato nel paragrafo 2.3.2, a livello microscopico la malattia di Alzheimer è caratterizzata dalla presenza di due segni distintivi localizzati principalmente nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale: placche amiloidi extracellulari composte da aggregati insolubili della proteina amiloide- β (A β) e

grovigli neurofibrillari intraneuronali, composti dalla proteina TAU iperfosforilata.

HSV-1 accelera significativamente la formazione di amiloide $A\beta_{42}$ e $A\beta_{40}$ attraverso l'induzione della via amiloidogena dell'APP e catalizza l'aggregazione di $A\beta_{42}$, uno dei principali costituenti delle placche amiloidi nell'AD.⁷⁴ Per dimostrare questo meccanismo, sono stati infettati con HSV-1, per via intra-cranica, topi transgenici 5XFAD¹, modello ampiamente utilizzato per AD, ed è stato osservato un aumento significativo di $A\beta_{42}$ nell'ippocampo e nella corteccia 48 ore dopo l'infezione rispetto agli animali trattati con il solo veicolo.⁷⁵ Inoltre, è stato evidenziato come una sequenza interna della glicoproteina B (gB) di HSV-1 presenta un'elevata omologia con la regione carbossi-terminale del peptide $A\beta$: il frammento di gB forma strutture a foglietto β , si auto-assembla in fibrille strutturalmente indistinguibili da $A\beta$, accelera la formazione di fibrille $A\beta$ ed è tossico per i neuroni corticali.⁷⁶ L'ingresso di HSV-1 nei neuroni corticali provoca la depolarizzazione della membrana cellulare, mediata dall'inibizione della corrente del potassio e dall'attivazione persistente dei canali del sodio, con conseguente ipereccitabilità neuronale. La depolarizzazione della membrana provoca anche un rapido aumento del calcio libero intracellulare che induce la fosforilazione di APP⁷⁷; quest'ultima favorisce l'attività dell'enzima β -secretasi e quindi la scissione di APP con conseguente generazione di $A\beta$. Piacentini e De Chiara hanno dimostrato che l'infezione con HSV-1 di cellule di neuroblastoma umano e di neuroni corticali di ratto è seguita da scissioni multiple di APP, che provocano un accumulo intra ed extra cellulare di varie specie neurotossiche:

- $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$: $A\beta$ esiste in due forme principali che differiscono in lunghezza, $A_{NL} 1-40$ e $A_{NL} 1-42$. Si ritiene che l'accumulo e l'aggregazione di queste proteine siano centrali nella patogenesi dell'AD. Studi recenti suggeriscono che l'accumulo intracellulare piuttosto che

¹ Il topo transgenico 5XFAD è un modello murino validato per lo studio dell'AD: è caratterizzato dalla over-espressione di tre mutazioni diverse del gene APP umano (proteina precursore della β -amiloide) e di due mutazioni del gene PSEN1 umano (componenti della γ -secretasi, enzima coinvolto sia nella via amiloidogena che non-amiloidogena di processamento dell'APP). Tale modello presenta le principali caratteristiche dell'AD come deposizione di amiloide, gliosi e progressiva perdita neuronale, con conseguente declino cognitivo e motorio; non presenta tuttavia grovigli neurofibrillari dovuti all'iperfosforilazione della proteina tau.⁷⁵

extracellulare di A_{NL} 1-42 sia un evento precoce nell'AD e che la sua oligomerizzazione porti a disfunzione neuronale e morte cellulare.⁷⁸

- Frammenti APP (APP-Fs) di 35 e 45 kDa (APP-F35 e APP-F45) che contengono porzioni di A β ; l'analisi in Western Blot dei lisati di cellule infette suggerisce che APP-F35 potrebbe essere un oligomero di A β
- APP-Fs intracellulare C-terminale e APP-Fs N-terminale: frammenti che includono parti della sequenza A β

Queste scissioni multiple di APP sono prodotte da enzimi che partecipano alla via amiloidogena del metabolismo di APP, come le β -secretasi, le γ -secretasi ed enzimi caspasi-3 like. L'attività di questi enzimi è fortemente aumentata in condizioni di stress ossidativo ed è noto che l'infezione da HSV-1 porti le cellule ospiti verso uno stato pro-ossidante. Inoltre, nelle cellule neuronali murine l'infezione aumenta la formazione di ROS, specie reattive dell'ossigeno, e prodotti di perossidazione lipidica: alti livelli di questi prodotti sono stati ritrovati in aree cerebrali colpite da HSV-1.⁷⁹

2.3.3.2 Effetti di HSV-1 sulla proteina tau

L'infezione da HSV-1 può avere effetti anche sulla proteina tau associata ai microtubuli: il virus innesca l'iper-fosforilazione di tau e conseguente aggregazione, portando alla formazione di grovigli neurofibrillari (NFT), un segno distintivo dell'AD e determinando cambiamenti neurodegenerativi, tra cui alterazioni nella dinamica dei microtubuli, danni al citoscheletro e perdita neuronale.⁷² In particolare, la fosforilazione di tau può avvenire in diversi siti amminoacidici, tra cui Serina 202, Treonina 212, Serina 214, Serina 396 e Serina 404; tale iper-fosforilazione può essere causata da HSV-1, che induce l'attività della glicogeno sintasi chinasi 3 β (GSK-3 β) e della protein chinasi A (PKA), enzimi che causano la fosforilazione in questi siti.⁸⁰

Anche le cellule di neuroblastoma infettate da HSV-1 sviluppano livelli aumentati di tau iperfosforilata all'interno dei loro nuclei e producono maggiori quantità

degli enzimi che fosforilano la proteina tra cui la glicogeno sintasi chinasi-3 β (GSK-3 β) e la proteina chinasi A.⁷³ Lo studio di Lerchundi et al. ha inoltre evidenziato come un altro evento associato alla neurodegenerazione, la scissione di tau indotta dalla caspasi-3, è innescato *in vitro* dall'infezione da HSV-1 in colture neuronali. Tale modificazione della proteina tau aumenta la sua cinetica di aggregazione in grovigli neurofibrillari ed è stata osservata anche in patologie neurodegenerative come l'AD.⁸¹

Complessivamente questi dati supportano fortemente l'ipotesi che HSV-1 possa contribuire all'accumulo di biomarcatori di AD nella corteccia e nell'ippocampo, innescando processi neurodegenerativi e deterioramento cognitivo, i segni clinici tipici della malattia di Alzheimer.

2.3.3.3 Effetti di HSV-1 sull'autofagia nelle cellule neuronali

L'autofagia è un processo cellulare che svolge un ruolo fondamentale nella rimozione di proteine mal ripiegate o aggregate, di organelli danneggiati e di patogeni intracellulari. Pertanto è considerata un meccanismo di sopravvivenza cellulare e una deregolazione può portare a morte cellulare non apoptotica. Promuove inoltre la senescenza cellulare e la presentazione di antigeni, protegge dall'instabilità del genoma, mantiene l'omeostasi e previene la necrosi: tale processo acquista così un ruolo chiave nella prevenzione di malattie come il cancro, il diabete, le malattie autoimmuni, le infezioni e la neurodegenerazione.⁸² Nell'autofagia il sequestro del citoplasma all'interno di una struttura avvolgente a doppia membrana determina la formazione di un vacuolo, chiamato autofagosoma; la degradazione di substrati citoplasmatici inizia quando l'autofagosoma si fonde con compartimenti degradativi del sistema endosomiale-lisosomiale. L'autofagia costitutiva nei neuroni impedisce l'accumulo di proteine danneggiate ed è essenziale per la sopravvivenza cellulare: un'autofagia iperattiva o disfunzionale può portare a morte cellulare programmata "autofagica" nelle cellule neuronali e indurre così neurodegenerazione.⁸³ La compromissione dell'autofagia è stata riscontrata nel cervello di pazienti affetti da AD: tramite microscopia elettronica, infatti, sono stati rilevati assoni anormali contenenti molti

vacuoli autofagici, condizione che non si verifica invece in cervelli sani. La scarsità di autofagosomi e di altri intermedi del vacuolo autofagico in condizioni non patologiche ha fatto ipotizzare che l'autofagia basale sia normalmente bassa; di conseguenza si ipotizza che la frequente presenza di vacuoli autofagici negli stati neurodegenerativi rifletta un'induzione dell'autofagia.⁸⁴ In condizioni fisiologiche, esiste un equilibrio tra la formazione di autofagosomi e la loro clearance da parte dei lisosomi; tale equilibrio risulta essere alterato nella malattia di Alzheimer, poiché si verifica una riduzione della clearance dei vacuoli autofagici.⁸⁴ Questo può comportare nel cervello di soggetti affetti da AD, un aumento della presenza di substrato APP negli endosomi trasportati lungo l'assone: la successiva fusione con la membrana cellulare porta al rilascio del prodotto di degradazione A β , che successivamente si deposita per formare placche amiloidi extracellulari.⁸⁵

Un tipo particolare di autofagia è la xenofagia, ossia la degradazione autofagica di agenti patogeni (virus), e rappresenta un mezzo di difesa importante per l'ospite. La xenofagia di HSV-1 dipende dall'attivazione della proteina chinasi R (PKR), un enzima dipendente da RNA a doppio filamento che regola l'autofagia, in combinazione con il pathway del fattore eIF2 α . Le proteine virali ICP 34.5 e Us11 svolgono un ruolo nell'inibire la risposta autofagica all'infezione virale. Us11 blocca la fosforilazione di eIF2 α da parte di PKR, mentre il fattore di neurovirulenza ICP34.5 recluta la fosfatasi PPP1CA, coinvolta nella defosforilazione di eIF2 α : entrambe queste azioni inibiscono la degradazione autofagica delle proteine HSV-1.⁷³ Infine, l'infezione da HSV-1 nelle cellule di neuroblastoma umano compromette l'autofagia portando all'accumulo di autofagosomi contenenti A β . Questi autofagosomi non si fondono con i lisosomi con conseguente accumulo intraneuronale di A β ⁷³

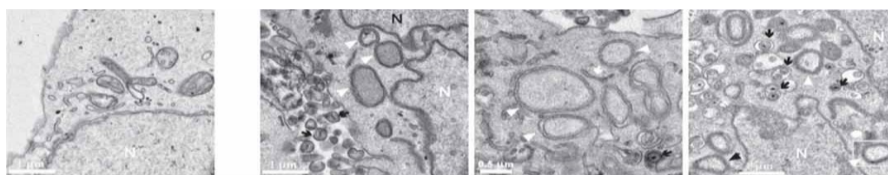


Figura 22: L'infezione da HSV-1 porta all'accumulo di autofagosomi intracellulari (freccie bianche). Le freccie nere rappresentano vescicole virali citoplasmatiche e virioni citoplasmatici liberi.⁷³

2.3.4 Fattori genetici

Un concetto importante relativo a HSV-1 è che la suscettibilità e l'esito dell'infezione sono modulati da fattori genetici: l'herpes labiale si manifesta solo nel 20-40% della popolazione, nonostante molte persone vengono infettate senza comparsa di manifestazioni cutanee, suggerendo che la comparsa delle vescicole labiali, e quindi dei sintomi, dipenda anche da fattori relativi all'ospite. Allo stesso modo, l'aumentato rischio di manifestare AD in seguito all'infezione da HSV-1, dipende da fattori dell'ospite, come la predisposizione genetica: il virus conferisce infatti un alto rischio di sviluppare la malattia nei portatori della variante allelica ApoE-ε4.⁸⁶ In questi soggetti l'HSV-1 latente è riattivato in modo intermittente da eventi come immunosoppressione, infezione periferica e infiammazione, con conseguente accumulo di danno e successiva neurodegenerazione, che può culminare nello sviluppo di AD.⁸⁶ I principali meccanismi che potrebbero spiegare la relazione tra HSV-1 e ApoE sono i seguenti:

- Il sistema immunitario dei portatori ApoE-ε4 è più debole nel combattere l'infezione⁸⁷
- La riparazione dei danni è meno efficace⁸⁷
- Sia HSV-1 che ApoE, prima di legarsi a recettori specifici per l'ingresso nella cellula, competono per il legame con i proteoglicani eparan-solfato sulla superficie cellulare. L'isoforma ApoE-ε4 compete in misura minore delle altre isoforme, consentendo in questo modo una penetrazione maggiore di HSV-1 nelle cellule. Un'ulteriore conferma dell'importanza di questa proteina nell'infezione da HSV-1 viene fornita da studi su topi transgenici ApoE: la carica virale nel cervello è maggiore negli animali che esprimono l'allele umano ApoE-ε4, rispetto all'allele ApoE-ε3 . Questi dati suggeriscono che l'isoforma ApoE-ε4 facilita l'ingresso del virus nel cervello umano o consente al virus di diffondere e replicarsi in modo più efficiente.⁸⁶

- Un altro potenziale meccanismo di interazione tra HSV-1 e ApoE si verifica a livello dell'espressione genica virale durante l'infezione latente. L'esame dei gangli del trigemino in topi infetti con HSV-1 ha mostrato che l'espressione di LAT è minore nei portatori ApoE-ε4, suggerendo che il virus rimane più a lungo nella fase replicativa prima della latenza e, quindi prolunga la fase litica e la morte cellulare. HSV-1 e ApoE-ε4 promuovono sinergicamente la morte neuronale, morte che si verifica nell'AD.⁸⁶

Come mostrato in uno studio sui cervelli post mortem di AD di Itzhaki *et al.* e confermato da Lin *et al.*, né HSV-1 né l'allele *APOE-ε4* da soli sono risultati essere un fattore di rischio per l'AD. Tuttavia, la combinazione di HSV-1 con l'allele *APOE-ε4* ha aumentato il rischio di AD di un fattore 12.⁸⁹ HSV-1 nel cervello dei portatori di alleli *APOE-ε4* rappresentava oltre la metà dei pazienti con AD nello studio⁶⁵ Burgos e colleghi hanno inoculato topi con HSV-1 e misurato le concentrazioni di DNA virale cerebrale. Trentasette giorni dopo l'infezione, le concentrazioni di DNA cerebrale HSV-1 per topi wild-type *APOE*+ / + erano 13,7 volte superiori a quelle dei topi knockout *APOE*-/- . Le concentrazioni di DNA cerebrale HSV-1 per topi transgenici umani *APOE4* erano 13,6 volte superiori a quelle dei topi *APOE3*. L'apolipoproteina E4 sembrava facilitare la latenza di HSV-1 nel cervello molto più dell'apolipoproteina E3.⁹⁰ Questi studi sugli animali che associano *APOE-ε4* con un aumento della carica virale di HSV-1 nel cervello suggeriscono che la presenza combinata di HSV-1 nel cervello e dell'allele *APOE-ε4* sono coinvolti nella patogenesi dell'AD.⁶⁵

2.3.5 HSV-1 e neuroinfiammazione

L'infezione da HSV-1 nel cervello o nel sistema nervoso periferico provoca una risposta immunitaria innata e adattiva, come spiegato nel paragrafo 1.6, con l'induzione di un conseguente stato di neuroinfiammazione. Le cellule neuronali, infettate da HSV-1, aumentano la produzione di citochine pro-infiammatorie come le interleuchine IL-1β, IL-6 e, IL-8, TNF-α (*Tumor Necrosis Factors α*), IFN-γ, insieme alle chemochine MIP-1α, CCL5 (RANTES) e CXCL10. Una

vigorosa risposta immunitaria dell'ospite è fondamentale per inibire la replicazione virale, tuttavia l'instaurarsi di meccanismi di difesa eccessivamente aggressivi può avere conseguenze deleterie a lungo termine: infatti, livelli elevati di risposta pro-infiammatoria sono associati ad una maggiore gravità clinica.⁹¹ Inizialmente, la prima risposta all'infezione da HSV-1, prevede la produzione di IFN- γ , IL-6 e TNF- α da parte delle cellule gliali. Nello specifico, IFN- γ influenza la produzione di altre citochine pro-infiammatorie (come TNF- α) e può mediare direttamente la clearance del virus. Dopo una risposta iniziale, i livelli di IL-6 e IFN- γ diminuiscono, mentre la produzione di TNF- α aumenta ulteriormente. Quest'ultima è la citochina predominante presente nel ganglio trigemino in prossimità delle cellule infettate dal virus: la sua produzione limita la replicazione del virus nei neuroni inducendo l'apoptosi e blocca l'espressione genica di HSV-1.⁹² IL-6 è una citochina coinvolta nel supporto trofico e nella sopravvivenza dei neuroni e, può avere un ruolo nella riparazione del tessuto danneggiato, agendo come fattore di crescita per le cellule gliali.⁹² Infine, le cellule T CD8 sono essenziali per la clearance del virus dal ganglio trigemino e, dopo il riconoscimento dell'antigene, secernono IFN- γ e TNF- α per diminuire l'espressione e la replicazione genica del virus.⁹² La riattivazione di HSV-1 dallo stato di latenza, rappresentata dall'espressione di ICP4 a livello dei neuroni, è accompagnata da una sovra-regolazione dei marcatori neuroinfiammatori (ad esempio TLR-4 e interferone α/β) e dei primi marcatori neurodegenerativi (proteina tau iper-fosforilata) che possono portare a disfunzioni neuronali cumulative.⁹³ L'evidenza di una risposta infiammatoria nell'AD include cambiamenti nella morfologia della microglia - da ramificata (a riposo) ad ameboide (attiva) e astrogliosi (manifestata da un aumento del numero, delle dimensioni e della motilità degli astrociti) che circondano le placche senili. Inoltre, le placche amiloidi sono positive per i marcatori di attivazione e i mediatori proinfiammatori, tra cui MHC classe II, Cox-2, MCP-1, TNF- α , IL-1 β e IL-6. MCP-1 è noto per indurre la chemiotassi degli astrociti e contribuisce al reclutamento di astrociti attorno alle placche senili. Inoltre, livelli elevati di chemochine e citochine, sono stati riportati nei cervelli AD post-mortem.⁹⁴ Quest'ambiente infiammatorio che si crea può promuovere la fosforilazione di tau

e la conseguente formazione dei grovigli neurofibrillari, segno distintivo della malattia di Alzheimer. Infine, aggregati di A β , generati dalla scissione di APP da parte degli enzimi β e γ -secretasi, attivano la microglia e inducono la produzione di fattori, come l'ossido nitrico (NO), ROS, citochine proinfiammatorie (ad esempio, TNF- α , IL-1 β , IL-6), chemochine (ad esempio, IL-18) e prostaglandine (ad esempio, PGE2), che promuovono la morte neuronale.⁹⁵

2.3.6 HSV-1 e stress ossidativo

Lo stress ossidativo, ossia l'aumento della generazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e delle specie reattive dell'azoto (RNS), è una caratteristica comune di molte infezioni virali.⁹⁶ Comporta danni ossidativi al tessuto ospite e alle biomolecole fondamentali delle cellule, tra cui proteine, lipidi e acidi nucleici; può causare inoltre disfunzione cellulare e fenomeni come senescenza accelerata, proliferazione anormale, risposte infiammatorie deregolate e morte cellulare.⁹⁷ L'infezione da HSV-1 è associata alla generazione di stress ossidativo nelle cellule infette, in quanto il virus induce l'esaurimento del glutathione, una delle principali difese antiossidanti, aumenta i livelli di ROS e provoca perossidazione lipidica.⁹⁸ Dallo studio di Kavouras et al. emerge che l'infezione di cellule neurali murine con HSV-1 induce un significativo aumento nella produzione di malondialdeide (MDA) e idrossialchenali (4-HAE), i principali prodotti di perossidazione lipidica, già dopo 2 ore dall'infezione. Questi risultati *in vitro* indicano che l'infezione da HSV-1 induce perossidazione lipidica e rilascio di MDA e 4-HAE, con conseguente danno alle principali macromolecole cellulari nei neuroni e alle strutture cerebrali, potendo così contribuire al processo di neurodegenerazione.⁹⁹ Un numero crescente di studi indica lo stress ossidativo come chiave nella patogenesi delle malattie neurodegenerative.⁹⁸ Il sistema nervoso è particolarmente suscettibile allo stress ossidativo dato il suo alto contenuto di acidi grassi polinsaturi, l'elevata domanda di ossigeno e bassi livelli di antiossidanti. Nel cervello di pazienti affetti da AD è stato riportato un aumento dei marcatori di stress ossidativo (danni al DNA e perossidazione lipidica) e dati

sperimentali da modelli animali di AD confermano la presenza di stress ossidativo durante lo sviluppo precoce della malattia.⁹⁸ Lo stress ossidativo promuove l'attività degli enzimi β - e γ - secretasi, incrementando così la scissione proteolitica di APP per generare il peptide A β . Inoltre, viene aumentata inoltre la permeabilità della barriera emato-encefalica, attraverso l'inibizione dell'espressione della proteina 1 (LRP-1), coinvolta nella rimozione di A β dal parenchima cerebrale: la modifica covalente di questa proteina, dovuta al danno ossidativo, favorisce così la deposizione e l'accumulo di questo peptide neurotossico.¹⁰⁰ Un'altra caratteristica importante della patogenesi dell'AD è che lo stress ossidativo può innescare un ciclo attivo di neuroinfiammazione cronica: questo può promuovere ulteriore stress ossidativo e può contribuire alla disfunzione neuronale irreversibile e morte cellulare. L'interazione tra stress ossidativo e neuroinfiammazione porta a generazione di A β . Pertanto, lo stress ossidativo e l'infiammazione sono importanti nella cascata patogena della neurodegenerazione nell'AD, suggerendo che gli sforzi terapeutici mirati a entrambi questi meccanismi possono essere utili.¹⁰⁰

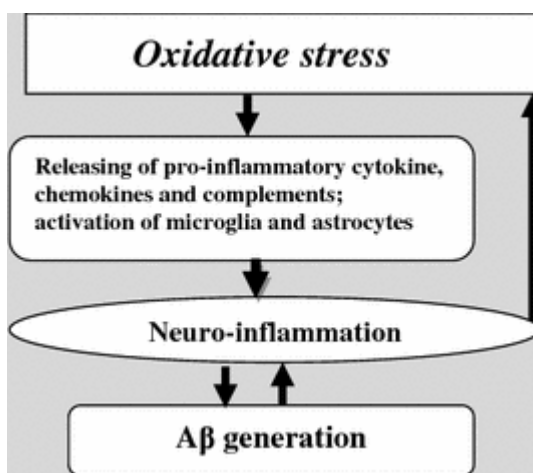


Figura 23: Stress ossidativo. Lo stress ossidativo contribuisce alla generazione di A β attraverso l'infiammazione innescata dalla condizione ossidativa, principalmente includendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie.

Ad esempio, lo stress ossidativo attiva microglia e astrociti per aumentare l'espressione di IL-1, una citochina pro-infiammatoria che contribuisce alla

degenerazione neuronale attraverso la sovra-espressione di APP e la conseguente formazione e deposizione di A β .¹⁰⁰

2.4. SISTEMA NERVOSO ENTERICO E MALATTIA DI ALZHEIMER

2.4.1 Sistema nervoso enterico

Il tratto gastrointestinale differisce dagli altri organi periferici in quanto ha un esteso sistema nervoso intrinseco, chiamato Sistema nervoso enterico (SNE), che può controllare le funzioni intestinali, anche indipendentemente dal Sistema nervoso centrale (SNC).¹⁰¹ Il SNE è la più grande divisione del Sistema nervoso periferico (SNP) e viene spesso indicato come il “secondo cervello” nell’intestino perché condivide molte caratteristiche con il cervello, tra cui la presenza di neuroni e cellule gliali, i neurotrasmettitori utilizzati per la trasmissione sinaptica, programmi trascrizionali simili per generare diversità neuronale e contiene un numero di neuroni enterici che oscilla tra 400 e 600 milioni, quasi equivalente al numero di neuroni presenti nel midollo spinale.¹⁰² Neuroni e cellule gliali del SNE sono raggruppati in tanti piccoli gangli connessi tra loro mediante fasci di fibre nervose che formano i due plessi maggiori gangliari, il plesso sottomucoso e il

plesso mienterico. Il plesso sottomucoso (SMP) (o plesso di Meissner) , localizzato tra lo strato muscolare circolare e la muscolaris mucosae, è responsabile del coordinamento delle secrezioni intestinali, dell'assorbimento e del flusso sanguigno locale; il plesso mienterico (o plesso di Auerbach), localizzato tra lo strato longitudinale e lo strato circolare della muscolatura liscia, è invece responsabile del coordinamento delle contrazioni e dei rilassamenti della muscolatura liscia intestinale.¹⁰³ Per una corretta funzionalità intestinale, è richiesto che entrambi i plessi siano intatti e mantengano interazioni con le cellule bersaglio.

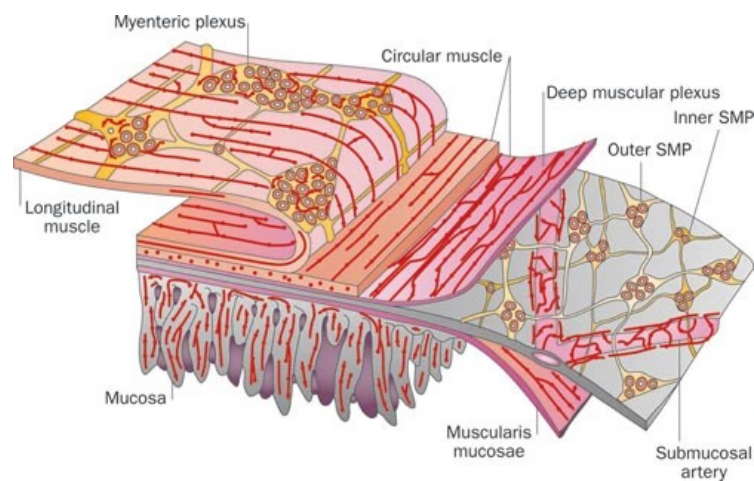


Figura 24: Organizzazione del Sistema Nervoso Enterico¹⁰¹

Il SNE svolge diverse funzioni: controllare la secrezione acido gastrica, regolare il movimento del fluido attraverso l'epitelio di rivestimento, cambiare il flusso sanguigno locale, interagire con il sistema immunitario ed endocrino dell'intestino, mantenere l'integrità della barriera epiteliale tra il lume intestinale e le cellule e i tessuti all'interno della parete intestinale.¹⁰¹

Il SNE lavora in collaborazione con input vagali, simpatici e parasimpatici per regolare le diverse funzioni intestinali; questa comunicazione bidirezionale tra il SNE e le altre parti del sistema nervoso può servire come condotto per la trasmissione di proteine patogene e particelle infettive. Non solo il SNE è un potenziale portale per la patogenesi delle malattie neurodegenerative, ma vi è una

crescente evidenza che il SNE è anche un bersaglio di questi disturbi. La disfunzione del SNE può essere associata a una serie di sintomi gastrointestinali tra cui grave stitichezza, anoressia e svuotamento gastrico ritardato, che sono tutti comuni nei pazienti con condizioni neurodegenerative.¹⁰²

I gangli del SNE sono avvolti da cellule gliali, affini agli astrociti (le loro controparti del SNC), che, rivestendo con le loro estensioni il soma dei neuroni, li separano dai tessuti adiacenti costituendo una vera e propria barriera che assomiglia alla barriera emato-encefalica.¹⁰⁴

2.4.1.1 Sistema nervoso enterico e HSV-1: modello di infezione

Un grosso limite allo studio dei meccanismi con cui l'HSV-1 può causare, nel corso di una infezione cronica, neuro-degenerazione è la mancanza di un modello sperimentale adeguato. A tal proposito nel nostro laboratorio di ricerca è stato messo a punto un modello di infezione persistente da HSV-1 del sistema nervoso enterico (SNE) in cui inizialmente i topi sono stati infettati, tramite somministrazione intranasale (IN), con 1×10^2 PFU di HSV-1 (10 μ L volume finale), portando all'infezione latente nel ganglio del trigemino e possibilmente nel sistema nervoso centrale. Quattro settimane dopo, i topi hanno ricevuto 1×10^8 PFU di HSV-1 in volume finale di 100 μ L per via orogastrica (OG), utilizzando un catetere da 9 cm di calibro 24. I topi controllo hanno ricevuto volumi uguali di lisato di cellule Vero per via intranasale o orogastrica (infezione fittizia). Dopo l'inoculo orogastrico e in seguito a deglutizione, le particelle infettive di HSV-1 possono raggiungere il Sistema Nervoso Enterico e stabilire un'infezione che dura per almeno tre settimane. Durante l'infezione, sono stati osservati livelli fluttuanti di espressione genica virale e significative infiltrazioni di macrofagi nel SNE direttamente collegate alla disfunzione intestinale. Sebbene a livelli fluttuanti, l'RNA di geni precoci immediati (ICP4, ICP0, ICP27 e ICP47), precoci (timidina chinasi, tk) e tardivi (VP16 e gB) sono stati rilevati nel LMMP isolato dall'intestino tenue fino a 10 settimane dall'infezione. Utilizzando questo modello di infezione e ricercando i marcatori di neurodegenerazione nei neuroni enterici murini infetti, è stato possibile riscontrare che nelle fasi immediatamente

successive all'infezione si ha un accumulo sia di APP che di oligomeri di A β che sono normalmente poco espressi nei neuroni non infetti. Per quanto riguarda l'espressione della proteina Tau, è stato rilevato nel LMMP un aumento della forma fosforilata a 10 mesi dall'infezione primaria. Infine, nei neuroni ottenuti da topi infettati in vivo con HSV-1 è stato rilevato un aumento dei ROS prodotti a livello mitocondriale indicando una condizione di stress ossidativo nelle cellule. Nei pazienti con AD è stato inoltre dimostrato un calo nella liberazione del neurotrasmettitore acetilcolina (Ach): con modello murino sono state analizzate le concentrazioni di acetilcolina nel plesso mienterico a diversi intervalli di tempo dall'infezione con HSV-1. I dati ottenuti dimostrano una significativa riduzione nei livelli di Ach a seguito dell'infezione da HSV-1, sino a raggiungere l'85% nei topi sacrificati alla decima settimana d'infezione. Quindi, osservando che l'infezione da HSV-1 nei neuroni del SNE genera un fenotipo AD-like con l'accumulo di A β , APP e proteina tau iper-fosforilata, questo modello di infezione rappresenta un buon modello per lo studio dei meccanismi patogenetici della neurodegenerazione causata da HSV-1.

2.4.2 Gli astrociti

Gli astrociti sono una classe importante di cellule gliali che svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi del SNC: interagiscono con i vasi sanguigni e le sinapsi, immagazzinano e forniscono energia, mantengono l'ambiente extracellulare dopo l'attività neuronale, forniscono fattori trofici, interagiscono con microglia e con cellule immunitarie. Queste funzioni sono importanti per mantenere una corretta attività neuronale, prevenire lo stress ossidativo e abilitare funzioni cerebrali di base come l'apprendimento e la memoria.¹⁰⁵ Gli astrociti possono essere suddivisi in due tipi principali, sulla base delle differenze nella morfologia cellulare e nella posizione anatomica:

- Astrociti fibrosi: si trovano nella sostanza bianca, presentano una morfologia stellata, numerose diramazioni cilindriche che si irradiano dal

soma cellulare ai capillari. Questi processi risultano essere molto lunghi, con poche o nulle ramificazioni intermedie.

- Astrociti protoplasmatici: si trovano nella sostanza grigia, hanno una forma stellata come gli astrociti fibrosi ma si distinguono da questi per la lunghezza dei propri processi, che risultano essere più corti, e più ramificati, formando dei foglietti membranosi nei pressi del corpo cellulare dei neuroni e attorno agli assoni neuronali.¹⁰⁶

Gli astrociti estendono i loro processi di ramificazione mettendoli in contatto diretto con i corpi cellulari dei neuroni, dendriti e terminali sinaptici. Questa stretta vicinanza fisica consente agli astrociti di percepire e rispondere alle attività neuronali e di regolare il flusso sanguigno per le forniture di ATP, glucosio e ossigeno.¹⁰⁷

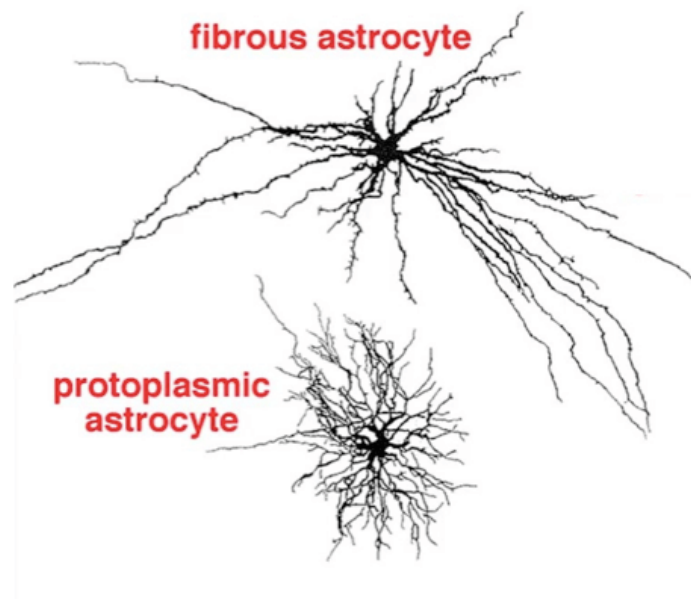


Figura 25: Morfologia cellulare degli astrociti fibrosi e protoplasmatici¹⁰⁷

2.4.2.1 Gliosi reattiva o astrogliosi

Una caratteristica comune in molte patologie del SNC è l'astrogliosi o gliosi reattiva, un processo di attivazione e di proliferazione degli astrociti in aree danneggiate del SNC. Caratteristiche comuni degli astrociti reattivi sono l'aumento dell'espressione di GFAP, proteina acida fibrillare gliale e l'ipertrofia, un cambiamento morfologico in cui gli astrociti mostrano un corpo cellulare allargato e i processi si polarizzano verso il sito di lesione. Questo cambiamento morfologico è legato all'aumentata espressione del filamento intermedio GFAP.¹⁰⁸ La reattività degli astrociti è innescata da una qualsiasi alterazione dell'omeostasi cerebrale. Queste cellule sono dotate di molti recettori e cascate di segnalazione intracellulare per rispondere rapidamente ai cambiamenti nel loro ambiente, tra cui i recettori di riconoscimento di molecole conservate (PRR), che rilevano segnali anomali nello spazio extracellulare (molecole virali o batteriche, proteine sieriche, proteine aggregate come A β ...), e aumento delle concentrazioni di alcune molecole (citochine, chemochine, purine). Una volta attivate da tali segnali, gli astrociti rilasciano ulteriormente molecole attive per creare uno stato reattivo come ad esempio purine, citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita.¹⁰⁸ L'astrogliosi reattiva è quindi una caratteristica comune associata sia a lesioni

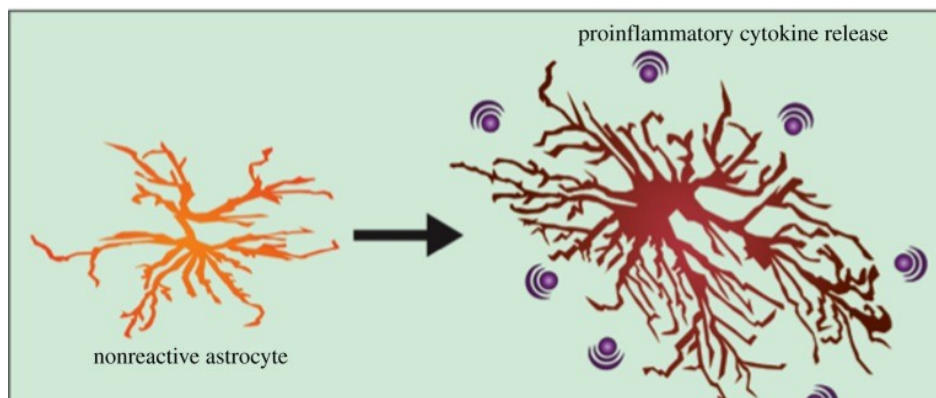


Figura 26: Condizione di astrogliosi. Aumento del numero di astrociti reattivi caratterizzati da ipertrofia dei processi e secrezione di citochine pro-infiammatorie

cerebrali acute che a condizioni neurologiche croniche come la malattia di Alzheimer.

Gli astrociti reattivi possono essere sia dannosi che benefici per le cellule circostanti e possono peggiorare o risolvere le lesioni iniziali del SNC:

- Sono necessari per la formazione di cicatrici, le quali aiutano a contenere la diffusione di cellule infiammatorie e per riparare gli insulti della barriera emato-encefalica
- Sono neurotossici in quanto producono specie reattive dell'ossigeno e citochine infiammatorie.¹⁰⁹

2.4.2.2 Il ruolo degli astrociti nella malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer è caratterizzata dalla presenza di placche di amiloide-beta extracellulare ($A\beta$) e grovigli neurofibrillari intracellulari (NFT).

Inizialmente si pensava che solo le cellule neuronali fossero la fonte principale di $A\beta$ ma prove crescenti suggeriscono che gli astrociti possono svolgere un ruolo aggiuntivo nell'AD secernendo quantità significative di $A\beta$, contribuendo al carico amiloide complessivo nel cervello.¹⁰⁹ Nell'AD gli astrociti reattivi circondano le placche amiloidi contribuendo alla risposta infiammatoria locale attraverso la secrezione di citochine pro-infiammatorie come $IFN\ \gamma$, $IL-1\beta$, $TNF\ \alpha$, $IL-6$ e $TGF\beta$. Questi astrociti attivati sono ipertrofici, come rilevato dall'aumento della superficie (48,06%-66,66%) e del volume (57,10-71,06) di GFAP.¹¹⁰ Gli astrociti subiscono alcuni cambiamenti durante la progressione della malattia: il numero complessivo di queste cellule rimane costante in tutto il cervello ma quelle in prossimità delle placche amiloidi diventano reattive, mentre le restanti si atrofizzano.¹¹¹ L'astrodegenerazione, definita come riduzione del volume e della superficie degli astrociti e diminuzione dei processi protoplasmatici, è stata osservata in modelli murini di AD. A partire dalla patologia precoce, prima della presenza di amiloide-beta, i topi AD mostrano astrodegenerazione

nell'ippocampo. Nelle fasi successive della malattia, la presenza di A β innesca una risposta astrogliale secondaria attivando gli astrociti, con conseguente astrogliosi reattiva nelle aree circostanti le placche.¹¹²

Si è a lungo pensato che i neuroni fossero l'unico tipo di cellula che esprimeva alti livelli di BACE-1 e quindi, fossero l'unica cellula in grado di produrre A β . Studi successivi hanno dimostrato che gli astrociti esprimono BACE1 a livelli sufficienti per generare A β e che l'espressione può essere aumentata dallo stress cellulare. Dato che gli astrociti sono in numero maggiore dei neuroni nel cervello, gli astrociti attivati possono rappresentare fonti significative di A β durante la neuroinfiammazione nell'AD.¹¹³ In particolare, l'espressione di BACE-1 è osservata negli astrociti reattivi intorno alle placche amiloidi. Sempre nel contesto neuroinfiammatorio dell'AD, inoltre, gli astrociti reattivi esprimono livelli elevati di APP e, quindi, potrebbero produrre più A β . Zhao *et al.* hanno dimostrato che negli astrociti primari del topo, la stimolazione con diverse combinazioni di citochine proinfiammatorie (LPS + IFN γ , TNF α + IFN γ e TNF α + IL-1 β + IFN γ) aumenta notevolmente l'espressione di APP. Le stesse citochine inducono anche aumenti della proteina BACE1 fino a otto volte. La conseguenza a valle è un aumento del 20-40% della secrezione di A β .¹¹³ Gli studi propongono che gli astrociti a riposo esprimano l'mRNA BACE1 ma non le

proteine, causando un blocco traslazionale che può inibire la produzione di A β . Lo stress potrebbe essere in grado di sovraregolare l'attività di BACE1 eludendo questo blocco traslazionale.¹¹⁴ Analogamente a quanto osservato per l'espressione di APP, le citochine pro-infiammatorie aumentano l'espressione di BACE-1:

- IFN γ induce l'espressione di BACE-1 negli astrociti primari di topo e la produzione di A β ¹¹⁵
- TNF α induce l'espressione di BACE1 e la produzione di A β negli astrociti in modo dose-dipendente.¹⁰⁹
- NF- κ B è un complesso proteico di fattori di trascrizione del DNA che svolge un ruolo nella produzione di citochine e nella sopravvivenza cellulare. Nel cervello invecchiato e nell'AD, i livelli di NF- κ B sono

aumentati. A β stimola l'attivazione di NF- κ B negli astrociti primari di ratto in modo dose-dipendente e tempo-dipendente.¹¹⁶

- È stato dimostrato che NF- κ B sopprime l'espressione di BACE1 negli astrociti non reattivi; tuttavia, ha l'effetto opposto negli astrociti primari attivati dal TNF α . Possiamo concludere che, nel contesto dell'infiammazione, quando gli astrociti sono reattivi, NF- κ B può indurre l'espressione di BACE1.¹¹⁷

In conclusione, gli astrociti attivati aumentano la produzione di A β e contribuiscono alla patogenesi dell'AD.

2.4.3 Cellule gliali enteriche (CGE)

La prima descrizione della glia enterica risale a oltre 115 anni fa “Caratterizzazione della costituzione dei gangli nel plesso intestinale” (Dogiel 1899). Il concetto di glia enterica come una classe unica di cellule è emerso negli ultimi 35 anni con il termine di “cellula gliale enterica”, coniato da Giorgio Gabella nel 1981.¹¹⁸ Le cellule gliali enteriche sono considerate come una rete di cellule che stabiliscono l'ambiente omeostatico all'interno dei gangli enterici e forniscono supporto strutturale e nutrizionale ai neuroni enterici. Si trovano principalmente nei plessi sottomucosi e enterici dell'SNE ma anche al di fuori dell'SNE, come nella lamina propria della mucosa, nel plesso mucoso e nel plesso sottosieroso del tessuto connettivo.¹⁰³ Nei mammiferi adulti, la glia enterica è più numerosa dei neuroni enterici, in rapporto 4:1. Possiede caratteristiche strutturali univoche, ossia dei lunghi prolungamenti laminari che rivestono gli assoni neuronali, e delle strette giunzioni cellulari che creano numerosi contatti sinaptici con vescicole localizzate nella rete nervosa. Sulla base della localizzazione all'interno degli strati dell'intestino, è stato recentemente proposto di caratterizzare morfologicamente le CGE in 4 tipi: una morfologia a forma di stella, di tipo I all'interno dei gangli; una a morfologia più allungata, tipo II, per la CGE intergangliare; tipo III per la mucosa; e tipo IV per la CGE intramuscolare.¹¹⁹

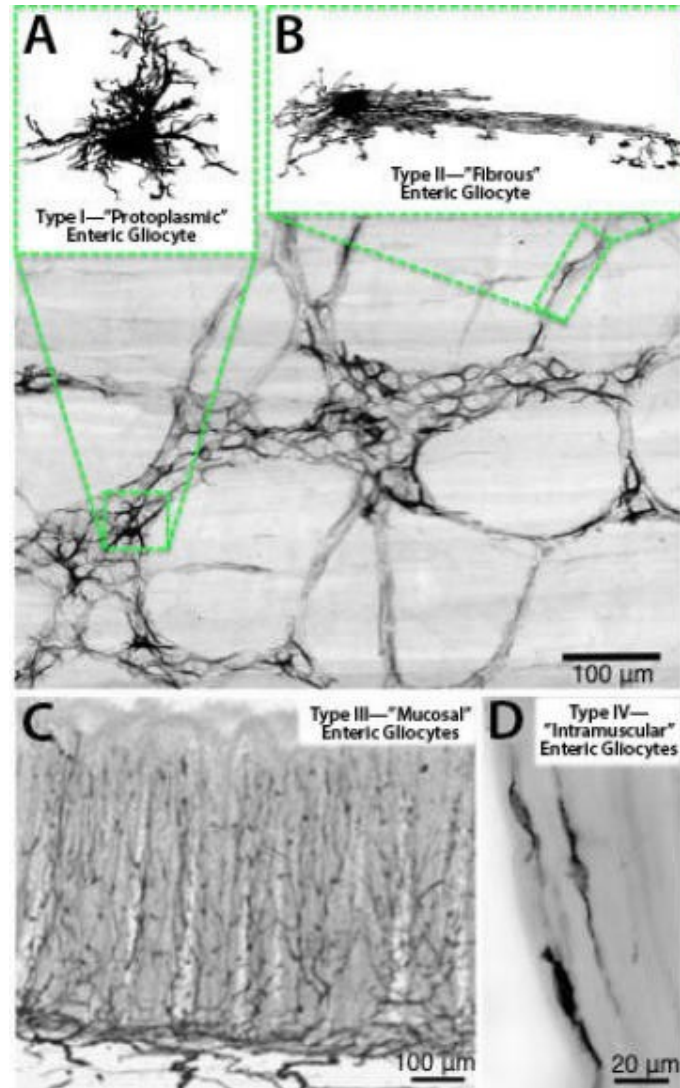


Figura 27: Struttura delle cellule gliali enteriche. Dal punto di vista morfologico sono suddivise in 4 tipi

Morfologicamente, le CGE sono paragonabili agli astrociti nel SNC. Come la loro controparte del SNC, sono piccole cellule che avvolgono i corpi cellulari neuronali enterici e i fasci di assoni ed estendono i loro processi nella mucosa intestinale. Le CGE assomigliano anche agli astrociti nella loro espressione di marcatori di identificazione tipici, che includono la proteina acida fibrillare gliale a filamento intermedio (GFAP), la proteina B legante il calcio (S100B) e la glutammina sintetasi coinvolta nella detossificazione neuronale da glutammato e acido amminobutirrico.¹¹⁹

2.4.3.1 Marcatori specifici per l'identificazione delle cellule gliali: GFAP e S100b

Le cellule gliali enteriche esprimono, come gli astrociti, marcatori di identificazione tipici, tra cui GFAP e S100b. GFAP o proteina acida fibrillare gliale è il principale costituente proteico dei filamenti intermedi gliali di 8-9 nm negli astrociti fibrosi e protoplasmatici del SNC. Una funzione attribuita ai filamenti gliali è il loro ruolo come componente del citoscheletro nel definire e mantenere la forma dell'astrocita.¹²⁰ GFAP inoltre svolge un importante ruolo nella migrazione cellulare e nella motilità degli astrociti e una sua diminuzione può ridurre la resistenza del tessuto cerebrale a gravi sollecitazioni meccaniche. Nel SNC a seguito di lesioni, traumi, malattie, disturbi genetici, gli astrociti diventano reattivi e rispondono in un modo tipico, chiamato astrogliosi. L'astrogliosi è caratterizzata da una rapida sintesi di GFAP, dimostrata dall'aumento del contenuto proteico.¹²¹ Esistono 10 isoforme diverse di GFAP, e nella malattia di Alzheimer, gli astrociti mostrano un aumento della loro espressione.¹²² Allo stesso modo, nelle cellule gliali, in seguito a infiammazione o lesioni, si verifica un aumento della sintesi di GFAP.

La proteina B legante il calcio S100 (S100b) appartiene ad una famiglia di proteine a basso peso molecolare, caratterizzata da due siti di legame per il calcio con struttura elica-ansa-elica; questa famiglia di proteine è stata chiamata S100 poiché è solubile in una soluzione satura di solfato di ammonio al 100%. S100b è una proteina acida con peso molecolare di 21KDa e presenta una struttura omodimerica, cioè due polipeptidi identici legati tra loro da legami disolfuro.¹²³ Questa proteina è implicata nella regolazione Ca^{2+} dipendente di una varietà di funzioni cellulari, come la fosforilazione delle proteine, le attività enzimatiche, la proliferazione e il differenziamento delle cellule, l'organizzazione strutturale delle membrane, l'omeostasi intracellulare di calcio, l'infiammazione e la protezione dal danno cellulare ossidativo.¹²³ A livello intestinale, S100b è specificamente e fisiologicamente espressa dalle CGE.¹²⁴ Nel cervello, S100b in concentrazioni nanomolari, promuove la sopravvivenza neuronale, la crescita di neuriti e stimola

la proliferazione degli astrociti aumentando la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare. D'altra parte, concentrazioni micromolari di S100b sono state osservate in diverse neuropatologie, come la malattia di Alzheimer.¹²⁴ L'eccessiva concentrazione di S100b promuove l'espressione dell'ossido nitrico sintasi inducibile (NOSi) e di citochine pro-infiammatorie con conseguenti effetti dannosi sui neuroni.¹²³ Infatti, l'interazione tra S100b e il suo specifico recettore di segnalazione porta alla fosforilazione della proteina chinasi attivata dal mitogeno (MAPK) e alla conseguente attivazione del fattore nucleare- κB (NF- κB) che, a sua volta, porta alla trascrizione di diverse citochine pro-infiammatorie.¹²⁵ Quindi S100b secreto dalla cellule gliali esercita effetti trofici o tossici a seconda della sua concentrazione:

- A concentrazioni nanomolari, stimola la crescita di neuriti e la sopravvivenza dei neuroni
- A concentrazioni micromolari, stimola l'espressione di citochine pro-infiammatorie e induzione dell'apoptosi.

Negli studi sugli animali è stato osservato che, cambiamenti della concentrazione cerebrale di S100b, causa disturbi comportamentali e deficit cognitivi. Livelli di S100b sono elevati in specifiche regioni del cervello nei pazienti affetti da AD, in particolare nell'ippocampo e nel lobo temporale con localizzazione principalmente negli astrociti attivi che circondano le placche neuritiche.¹²⁷ Questi risultati dimostrano che la sovra-espressione di S100 β è specifica di alcune aree del cervello e correlata all'attivazione degli astrociti e suggeriscono che l'elevazione di S100 β al di sopra di una certa soglia è correlata al grado di coinvolgimento neuropatologico di diverse regioni cerebrali nell'AD.

2.4.3.2 Principali funzioni delle cellule gliali enteriche

Nell'ultimo ventennio, numerosi studi hanno dimostrato il ruolo attivo delle cellule gliali nella fisiologia e nella fisiopatologia del tratto gastrointestinale:¹²⁸

- Effetto delle cellule gliali enteriche sui neuroni enterici: le CGE forniscono supporto nutritivo e strutturale ai neuroni enterici;

contribuiscono all'apporto di nutrienti e al mantenimento dell'omeostasi cellulare.¹⁰³ In primo luogo, poiché i vasi sanguigni sono esclusi dal plesso neuronale enterico, le CGE agiscono come un unico tipo di cellula intermedia tra la circolazione generale e i neuroni enterici. Questa via può quindi rappresentare il mezzo predominante con cui i neuroni ricevono nutrienti e eliminano rifiuti metabolici; producono fattori neurotrofici come il fattore neurotrofico di derivazione gliale (GDNF) che promuove la proliferazione dei precursori neuronali e gliali derivati dalla cresta neurale e favorisce la differenziazione e la sopravvivenza dei neuroni; le CGE sono le uniche cellule ricche di granuli di glicogeno e possono così costituire una delle principali fonti di glucosio per i neuroni enterici¹²⁹; guidano lo sviluppo neuronale attraverso la segnalazione purinergica, la via neurotrofica P2Y purinergica, e permettono così la formazione dendritica, la guida assonale e la sinaptogenesi. È stato dimostrato infatti da Caterina Le Berre-Scoul et al. che i neuroni enterici, coltivati senza CGE, presentano complessità assonale e densità delle sinapsi notevolmente ridotte, suggerendo che i fattori derivanti dalle cellule gliali contribuiscono fortemente alla formazione del circuito neuronale.¹³⁰ Aumentano la sopravvivenza neuronale e riducono lo stress ossidativo e quindi la morte cellulare indotta da quest'ultimo; inoltre, i mediatori gliali come il glutatione e il GDNF esercitano effetti neuroprotettivi. Le CGE hanno recentemente dimostrato di essere le uniche cellule all'interno del SNE immunoreattive per la L-arginina, un substrato necessario per la sintesi dell'ossido nitrico (NO). L'NO è un mediatore della segnalazione intercellulare ed è considerato un importante neurotrasmettitore nell'SNE poiché i neuroni immunoreattivi della NO sintasi rappresentano il 20%-30% dei neuroni del SNE. Pertanto, le CGE possono rappresentare una delle principali fonti di L-arginina nel SNE, trasferendola ai neuroni quando necessario.¹²⁹ Oltre al loro probabile ruolo nel fornire metaboliti ai neuroni, le CGE sembrano regolare l'omeostasi perineuronale. L'attività neuronale è associata a un sostanziale rilascio di ioni K nello spazio extracellulare, in particolare nello spazio perisinaptico.

A causa dei potenziali effetti di eccitotossicità che questo può avere sui neuroni enterici, le concentrazioni di ioni extracellulari devono essere strettamente controllate.¹²⁹ Le CGE tamponano gli ioni K extracellulari in eccesso rilasciati durante l'attività neuronale attraverso canali del potassio, e il K intracellulare viene quindi ridistribuito attraverso il sincizio gliale in aree a basse concentrazioni extracellulari di K.¹³¹ Un'altra caratteristica delle CGE, fortemente indicativa del loro coinvolgimento nel controllo dell'omeostasi perineuronale e dell'attività neuronale, è l'espressione della glutammina sintetasi, che, nell'ENS, è limitata agli EGC.¹³² La glutammina sintetasi è coinvolta nella disintossicazione dei neurotrasmettitori glutammato e acido γ -aminobutirrico (GABA) e dell'ammoniaca di scarto prodotta dai neuroni.

- Regolazione della motilità gastrointestinale: un'alterata funzionalità delle cellule gliali enteriche può influire sulla motilità gastrointestinale, con conseguente riduzione dello svuotamento gastrico e del transito intestinale. Questi cambiamenti nella motilità sono associati ad una riduzione del fenotipo nitrergico nel SNE.¹³³ Infine, la delezione specifica della proteina alfa-1 di giunzione gap (GJA1), nota anche come connexina 43 (Cx43) inibisce la capacità della glia di propagare Ca^{2+} . L'attenuazione in vivo del Ca^{2+} nella rete gliale enterica rallenta il transito intestinale e il transito del colon probabilmente alterando la comunicazione dipendente dall'adenosina trifosfato, tra glia-glia e/o neuro-glia.¹³⁴
- Mantenimento dell'integrità della barriera epiteliale intestinale (BEI): le CGE sono un regolatore centrale della barriera epiteliale intestinale. *In vivo*, una grave ablazione delle cellule gliali indotta da digiunoileite fulminante, ha portato ad interruzioni dell'integrità della BEI; l'ablazione meno grave invece, ha aumentato la permeabilità paracellulare anche in assenza di infiammazione intestinale.¹³³ Il ruolo della glia enterica nel mantenimento dell'integrità intestinale è stato dimostrato anche in animali transgenici, dove l'ablazione delle cellule gliali determinava la degenerazione dei plessi mienterici e l'alterazione dell'integrità epiteliale

con susseguente grave infiammazione intestinale ed infine morte dell'animale stesso.¹³⁵ Le CGE inoltre, aumentano la resistenza della BEI in risposta a fattori di stress, come batteri e mediatori infiammatori e regolano i processi coinvolti nella riparazione della barriera epiteliale dopo un danno meccanico o infiammatorio. Questo effetto è mediato da un fattore di crescita pro-epidermico derivato dalle CGE che ha permesso la diffusione delle cellule epiteliali intestinali tramite l'attivazione delle vie di adesione focale chinasi-dipendenti.

2.4.3.3 Ruolo delle cellule gliali enteriche nella risposta infiammatoria e immunitaria

La capacità delle cellule gliali enteriche di rispondere a segnali immunomodulatori come citochine, batteri e neurotrasmettitori nell'ambiente extracellulare suggerisce che la glia media una quantità significativa del cross talk tra il SNE e il sistema immunitario. Le CGE possono rilevare i livelli locali delle citochine pro-infiammatorie IL-1, IL-4 e TNF- α .¹⁰³ in quanto sono dotate di recettori che le abilitano a rispondere a stimoli infiammatori, come i recettori di strutture conservate della cellula batterica (recettori Toll-like 2 e 4) o delle citochine (IL-1 recettore42).¹³³ Il legame delle citochine ai recettori provoca l'attivazione delle cellule gliali, simile alla gliosi reattiva nel SNC, e contribuisce all'infiammazione e alla disfunzione gastrointestinale. Allo stesso modo, l'attivazione dei recettori Toll-like da parte del lipopolisaccaride (LPS) e altri componenti batterici attivano le vie pro-infiammatorie.¹⁰³ Questi mediatori, oltre a modificare le CGE intracellulari, possono anche regolare l'espressione di GFAP e di S100b. In particolare, citochine infiammatorie come IL-1, TNF- α , IFN- γ e composti batterici come il LPS aumentano l'espressione di GFAP e S100b.¹³³ Le CGE esprimono inoltre la sostanza P, un neuropeptide a corta catena che ha molteplici effetti sulle cellule immunitarie, tra cui l'induzione della degranolazione dei mastociti, l'innescò dell'attività pro-infiammatoria nei macrofagi e la promozione del traffico e della proliferazione dei linfociti.¹²⁹ Prove

crescenti suggeriscono che le CGE potrebbero contribuire direttamente alla risposta infiammatoria intestinale producendo mediatori dell'infiammazione. Infatti, dopo stimolazione con LPS o citochine, le CGE rilasciano mediatori come ossido nitrico, IL-1b e prostaglandina E2.¹³⁶ Hollenbach et al. hanno dimostrato in vitro che, nonostante le CGE non esprimano costitutivamente molecole di MHC di classe II, il trattamento con IFN- γ e TNF- α induce l'espressione sia delle molecole di MHC di classe II che di ICAM-1 (molecole di adesione intercellulare-1); di conseguenza le CGE acquistano la capacità di presentare l'antigene alle cellule T e quindi possono agire come cellule presentanti l'antigene. Complessivamente, queste osservazioni supportano l'ipotesi che le CGE sono mediatori immunitari nel tratto gastrointestinale.¹³⁷

Tuttavia, la glia umana in coltura attivata dal LPS, può anche aumentare la trascrizione di fattori di crescita e di geni anti-infiammatori: down-regolazione delle citochine pro-infiammatorie come TNF- α , IL-1b e interleuchina 6 (IL-6) e induzione dell'espressione di citochine anti-infiammatorie come IL-10 e di fattori di crescita come TGF β .¹³⁸ Questo paradossale innalzamento della trascrizione dei fattori di crescita e dei geni antinfiammatori con l'espressione simultanea di geni pro-infiammatori suggerisce una complessa regolazione dell'espressione genica che probabilmente coinvolge percorsi di feedback negativo. La risposta gliale ai componenti batterici nel SNE e la decisione se intraprendere percorsi pro- o anti-infiammatori dipendono dall'identità dei batteri e da quali molecole di segnalazione vengono coespresse.¹⁰³

2.4.4 Glia e neurodegenerazione

Una risposta infiammatoria mediata dalla glia è una componente importante nella fisiopatologia della malattia di Alzheimer. Come descritto nel paragrafo “Ruolo delle cellule gliali enteriche nella risposta infiammatoria e immunitaria” le cellule gliali enteriche attivate sovra-esprimono interleuchina-1 (IL-1), una potente citochina pro-infiammatoria e, allo stesso modo, gli astrociti attivati sovra-esprimono S100b, una citochina che promuove un'eccessiva crescita di neuriti. Molteplici fattori dell'attivazione gliale, tra cui l'invecchiamento, la genetica, i

traumi, causano la sovra-espressione di IL-1 e S100b e attivazione di cascate auto-propaganti che, con il tempo, possono comportare, cambiamenti neuropatologici caratteristici della malattia di Alzheimer.¹³⁹

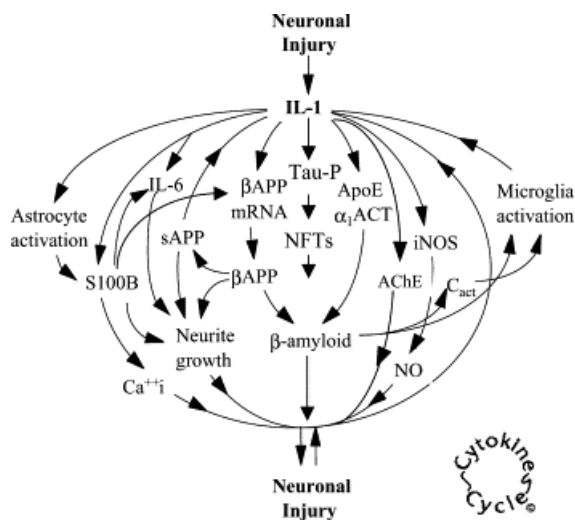


Figura 28: Ciclo delle citochine con attivazione di eventi infiammatori auto-propaganti che guidano la neurodegenerazione.¹³⁹

Come possiamo vedere dallo schema riportato in **figura 27**, l'attivazione delle cellule gliali stimola la sovra-espressione di IL-1 e di S100b, con induzione della crescita di neuriti, aumento dell'espressione di ossido nitrico inducibile (iNOS), di IL-6, di Apolipoproteina E; aumento della deposizione di β-amiloide, che si traduce in un' ulteriore sovra-espressione neuronale di APP e aumento dell'espressione dell'acetilcolinesterasi neuronale (AChE), che si traduce in diminuzione di acetilcolina e iperfosforilazione di Tau neuronale.¹³⁹

IL-1 sintetizzata e rilasciata dalla microglia attivata, induce la sintesi e l'elaborazione di APP, il conseguente deposito di placche di β-amiloide, la diffusione di queste placche e la conseguente degenerazione neuronale. Induce inoltre un'eccessiva fosforilazione di Tau (sia in vivo sia in vitro), con conseguente formazione di grovigli neurofibrillari caratteristici della malattia di Alzheimer.¹⁴⁰ Queste osservazioni suggeriscono quindi che l'induzione e la sovra-espressione di IL-1, derivata da cellule gliali attivate, possono dare origine

alla piena manifestazione della patologia di Alzheimer.¹³⁹

3. SCOPO DELLA TESI

Nelle patologie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer, è stato dimostrato un coinvolgimento della glia che assume un peculiare fenotipo andando incontro ad attivazione e proliferazione (astrogliosi o gliosi reattiva) con rilascio di molecole che contribuiscono ai fenomeni di neurodegenrazione nel SNC. In questo progetto di tesi, ci siamo proposti di verificare se le cellule gliali enteriche sviluppano un fenotipo *Alzheimer Disease-like* nel corso di una infezione persistente da HSV-1 del sistema nervoso enterico nel topo.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Modello murino di infezione in vivo da HSV-1 nel sistema nervoso enterico

Il protocollo sperimentale di infezione da HSV-1 utilizzato è stato approvato dall'Organismo Preposto al Benessere degli Animali (OBPA) dell'Università di Padova, seguendo le linee guida del Ministero della Salute Italiano, al fine di tutelare e promuovere il benessere degli animali utilizzati a fini scientifici o didattici. Per comprendere il coinvolgimento di HSV-1 nelle alterazioni del Sistema Nervoso Enterico (SNE), sono stati utilizzati topi maschi del ceppo wild-type C57/B16J (wild-tipe, WT) di 8 settimane acquistati da Envigo Company (Udine, Italia). Sono stati alloggiati in gabbie ventilate singolarmente con temperatura e umidità controllate ($22 \pm 2^\circ \text{C}$). La luce ed il buio presentavano cicli di 12 ore e gli animali erano nutriti con cibo per roditori e acqua *ad libitum*. Inizialmente i topi sono stati infettati, tramite somministrazione intranasale (IN), con 1×10^2 PFU di HSV-1 (10 μL volume finale) portando all'infezione latente nel ganglio del trigemino e possibilmente nel sistema nervoso centrale. Quattro settimane dopo, i topi hanno ricevuto 1×10^8 PFU di HSV-1 in volume finale di 100 μl per via orogastrica (OG), utilizzando un catetere da 9 cm di diametro 24. I topi controllo hanno ricevuto volumi uguali di lisato di cellule Vero per via intranasale o orogastrica (infezione fittizia) Dopo l'inoculo orogastrico, HSV-1 raggiunge i nervi enterici e stabilisce un'infezione che dura almeno dieci settimane.¹⁴¹ Per escludere cambiamenti neuropatologici, sono state effettuate valutazioni neurologiche nei topi infetti da HSV e topi controllo. Gli animali sono stati esaminati due volte al giorno ed è stata valutata la loro attività spontanea in gabbia, la loro capacità di avvicinarsi alle pareti della gabbia, la loro capacità di arrampicarsi.³ I topi sono stati sacrificati 4,6,8, o 10 settimane dopo la somministrazione orogastrica di HSV-1 tramite dislocazione cervicale. Nella tesi, per distinguere i diversi topi, utilizzerò le seguenti denominazioni:

- Topo controllo non sottoposto ad infezione da HSV: CTR
- Topo infettato con HSV-1 per 4 settimane: HSV-1_{4weeks}

- Topo infettato con HSV-1 per 6 settimane: HSV-1_{6weeks}
- Topo infettato con HSV-1 per 8 settimane: HSV-1_{8weeks}
- Topo infettato con HSV-1 per 10 settimane: HSV-1_{10weeks}

In seguito al sacrificio, l'intestino viene rimosso con pinze e forbici sterili e, l'ileo viene immerso in terreno per colture tissutali, RPMI Medium 1640 (1X) (Gibco), e tenuto in ghiaccio fino alla successiva rimozione del plesso mienterico.

4.2 Strip di plesso mienterico da ileo di topo

Tutte le operazioni descritte nel seguente protocollo si eseguono in cappa a flusso laminare per consentire il mantenimento della sterilità. Lo *strip* del plesso mienterico è stato effettuato per tutti i topi infettati a diverse tempistiche e topi controllo:

- Topo CTR
- Topo HSV-1_{4weeks}
- Topo HSV-1_{6weeks}
- Topo HSV-1_{8weeks}
- Topo HSV-1_{10weeks}

L'ileo di topo viene mantenuto in terreno RPMI e conservato a 4°C fino alla rimozione del plesso mienterico. Servendosi di pinze e forbici sterili, si taglia l'intestino in segmenti di 2-3 cm; utilizzando una siringa provvista di ago bottonuto, si eseguono dei lavaggi del lume intestinale al fine di rimuovere il contenuto fecale, con RPMI sterile per il topo controllo e RPMI sterile addizionato con aciclovir ²(1 µg/mL, Merck) (2 µL per ogni mL di terreno) per i topi infetti. Successivamente si infila una pipetta Pasteur in vetro sterile nel lume

² L'aciclovir interferisce con la sintesi del DNA virale prevenendo la riattivazione del virus. Una volta entrato nelle cellule infette subisce un processo di fosforilazione e si trasforma in aciclovir trifosfato; quest'ultimo, avendo una struttura molto simile alla guanosina trifosfato (un nucleoside che forma il nuovo filamento di DNA virale), viene incorporato nel filamento di DNA che si sta formando bloccando l'elongazione e la sintesi del DNA.

intestinale e con la pinzetta si rimuove il tessuto adiposo adeso alla parete intestinale. Si procede con la rimozione del plesso mienterico, LMMP (Longitudinal Muscle Myenteric Plexus): con un bastoncino di cotone si applica una leggera pressione sul tessuto e si eseguono prima dei movimenti verso l'alto e verso il basso, e poi in direzione orizzontale. In questo modo i frammenti di LMMP si sollevano dal tessuto sottostante, vengono raccolti con una pinzetta e conservati in 10 mL di RPMI nel caso di LMMP derivante da topo controllo oppure RPMI+aciclovir nel caso di LMMP da topi infetti da HSV-1. In seguito, il plesso mienterico verrà processato diversamente a seconda degli esperimenti che si intendono eseguire.

4.3 Analisi citofluorimetrica delle cellule del plesso mienterico murino

La citometria a flusso è una tecnica che fornisce una rapida analisi di singole cellule in soluzione utilizzando i laser come sorgenti luminose. L'interazione di ogni singola cellula con il fascio di luce incidente dà luogo a fenomeni di diffrazione (scattering) che vengono misurati in due direzioni diverse: la direzione frontale (Forward Scatter o FSC) e la direzione laterale (Side Scatter o SSC). Il Forward Scatter è determinato dalla diffrazione in relazione al diametro cellulare ed è quindi indice della dimensione della cellula; il Side Scatter è determinato dalla riflessione e rifrazione del raggio raccolta a 90° e indica la complessità interna e la granularità della cellula. È inoltre possibile marcare il campione con anticorpi coniugati ad un fluoroforo, che riconoscono specifici antigeni cellulari (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) : ogni singola cellula analizzata dal citofluorimetro può risultare positiva alla fluorescenza se esprime l'antigene di interesse, oppure negativa se l'antigene non viene rilevato. Al termine dell'analisi, lo strumento restituisce la percentuale di cellule positive sul totale.

In questo progetto di tesi, le analisi citofluorimetriche sono state eseguite a partire da LMMP, ottenuto come descritto nel paragrafo “ Strip di LMMP da ileo di topo” ; sono stati presi in considerazione i topi sacrificati a diverse tempistiche post-infezione (HSV-1_{4weeks} , HSV-1_{6weeks}, HSV-1_{8weeks}, HSV-1_{10weeks}), nonché il

topo controllo (CTR)

LMMP ottenuto dallo strip di oleo murino viene sottoposto ad un processo di digestione. La digestione viene eseguita aggiungendo 200 μ L di Collagenasi (1 mg/mL, Sigma Aldrich) e 20 μ L di DNase (1000 U/mL), enzimi che permettono la digestione della matrice extracellulare e del tessuto connettivo; si procede con un'incubazione di 20 minuti a 37°C. Terminata la digestione, si procede con la filtrazione utilizzando un filtro con pori di diametro di 100 μ m per permettere la rimozione di detriti tissutali. Si esegue successivamente una centrifuga a 1600 rpm, a 4°C per 6 minuti, si rimuove il surnatante per inversione e si risospende il precipitato cellulare in 1 mL di PBS/BSA 0,2%. Si ripete tale passaggio una seconda volta e si lascia incubare per 30 minuti. La soluzione di PBS/BSA è un tampone bloccante che si lega a tutte le proteine presenti nel campione e previene la formazione di legami aspecifici da parte degli anticorpi primari che vengono in seguito utilizzati al fine di individuare specifici antigeni cellulari di interesse. Si aggiungono in seguito 5 mL di PBS/BSA 0,2% e si aliquota la sospensione cellulare in diversi tubi a seconda dei marcatori ricercati. Successivamente si esegue una centrifuga a 1600 rpm, per 6 minuti a 4°C e si rimuove il surnatante per inversione. Si procede con l'aggiunta dell'anticorpo primario, precedentemente diluito in 100 μ L di una soluzione di PBS/BSA 0,2% Tween e si lascia incubare al buio per 30 minuti (**Tabella 1**). Ogni campione viene sottoposto ad una doppia marcatura, utilizzando un anticorpo primario per: GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein), marcatore specifico delle cellule della glia d'interesse, e un anticorpo che riconosce uno dei seguenti marcatori:

- IFN γ : citochina immunologica solubile dimerizzata prodotta dai linfociti.
- S100 β : proteina multifunzionale che lega il calcio, si trova nelle cellule della glia ed è coinvolta in processi infiammatori.
- QA2: complesso MHC I non canonico murino che inibisce le cellule Natural Killer.
- TLR2: glicoproteina transmembrana che appartiene alla famiglia dei recettori PRRs (Pattern Recognition Receptors), in particolare la famiglia dei Toll-Like Receptor. Riconosce e lega i PAMPs (molecole prodotte dai microrganismi) e attiva così vie di trasduzione del segnale che possono

stimolare processi immunitari implicati nell'inflammatione (produzione di citochine pro-inflammatorie).¹⁴²

- TLR4: proteina transmembrana che appartiene alla famiglia dei Toll-Like Receptors; la sua attivazione porta ad una via di segnalazione intracellulare NF-KB e alla produzione di citochine pro-inflammatorie, responsabile dell'attivazione del sistema immunitario innato.
- CD14: proteina umana prodotta dai macrofagi come parte del sistema immunitario innato. Agisce come co-recettore (insieme ai TLR4) per rivelare la presenza del LPS.
- MyD88: proteina adattatrice per le vie di segnalazione infiammatoria attraverso l'attivazione di NFkB.

Terminata l'incubazione con la soluzione di anticorpo primario, si aggiunge 1 mL di PBS/BSA 0,2%, si esegue una centrifuga a 1600 rpm, per 6 minuti, a 4°C e si rimuove il surnatante per inversione. Si aggiunge poi l'anticorpo secondario, precedentemente diluito in 100 µL PBS/BSA 0,2% Tween e si lascia incubare al buio per 30 minuti. (**Tabella 1**) Terminata l'incubazione si aggiunge 1 mL di PBS/BSA 0,2%, si centrifuga a 1600 rpm, per 6 minuti a 4°C e si rimuove il surnatante per inversione. Il precipitato viene risospeso in 100 µL di PBS/BSA 0,2% e si conserva il tutto a 4°C al buio in attesa di essere analizzato.

Tabella 1: Anticorpi primari e secondari utilizzati per l'analisi citofluorimetrica

Anticorpo	Tipologia	Ditta	Specie	Diluizione
Anti-glial fibrillary acidic protein, clone GA5	Primario	Millipore	Mouse	1:100
FITC Anti-mouse IFN γ clone XMGI.2	Primario coniugato FITC (488nm)	Invitrogen	Rat	1:100
Anti-mouse	Primario coniugato	eBioscience	Mouse	1:100

QA2 FITC clone 69H1- 9-9	FITC (488nm)			
CD14 (M- 305) sc-9150	Primario	SantaCruz Biotechnology	Rabbit	1:100
S100b Recombinant Anti- S100beta antibody (EP1576Y)	Primario	abcam	Rabbit	1:100
TLR2 (H- 175) sc- 10739	Primario	SantaCruz Biotechnology	Rabbit	1:100
TLR4 (H- 80) sc-10741	Primario	SantaCruz Biotechnology	Rabbit	1:100
Goat anti- Rabbit IgG (H+L) Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 A-21244	Secondario coniugato Alexa Fluor® 647nm	Invitrogen	Goat	1:200
Cy TM 3 AffiniPure Goat Anti- Mouse IgG (H+L)	Secondario coniugato Cy3 (594nm)	Jackson ImmunoResearch	Goat	1:200

4.4 Coating di vetrini con poli-D-lisina e laminina

Il *coating* è un procedimento di rivestimento di vetrini copri-oggetto effettuato in

questo specifico caso con poli-D-lisina e laminina, al fine di consentire l'adesione delle cellule della glia isolate da LMMP di ileo murino, come descritto nel paragrafo successivo. La laminina è una glicoproteina costituita da tre catene polipeptidiche unite da ponti disolfuro; è una proteina strutturale multi-dominio delle membrane basali e svolge diverse attività biologiche: favorisce l'adesione cellulare, influenza la proliferazione, la differenziazione e la motilità cellulare.¹⁴³ Poiché le molecole di laminina si staccano rapidamente durante la procedura di rivestimento, inizialmente i vetrini sono rivestiti con poli-D-lisina: una molecola sintetica contenente polimeri con peso molecolare di 50.000-150.000 Dalton che interagisce con la laminina migliorando così l'adesione delle cellule alle superfici in vetro.¹⁴³

Il procedimento di coating si esegue in cappa a flusso laminare per consentire il mantenimento della sterilità. I vetrini copri-oggetto, dopo essere stati autoclavati, vengono posizionati al centro dei pozzetti di una piastra 6-wells per colture cellulari, grazie all'ausilio di una pinzetta sterile. Si aggiungono 80 µL di poli-D-lisina (0,1 mg/mL, Sigma Aldrich) sul vetrino cercando di ricoprire la maggior superficie possibile; si aspettano 30 minuti ed eventualmente si rimuove l'eccesso. Quando la superficie dei vetrini è completamente asciutta, si prosegue con l'aggiunta di 80 µL di laminina (50 µg/mL, Sigma Aldrich), sempre ricoprendo la maggior superficie possibile del vetrino. Dopo 1 ora di incubazione a temperatura ambiente, si rimuove l'eccesso e si lasciano asciugare i vetrini per qualche minuto. La piastra può essere conservata a 4°C per due settimane.

4.5 Allestimento di colture di cellule gliali enteriche dal plesso menterico murino

Per l'isolamento di cellule gliali dal plesso nervoso menterico di topo CTR e HSV-1_{4 weeks}, abbiamo riadattato un protocollo precedentemente utilizzato per l'allestimento di colture neuronali.³ In seguito alla rimozione del plesso menterico, come descritto nel paragrafo "Strip di plesso menterico da ileo di topo" si eseguono tre centrifughe a 1600 rpm, a 4°C per 5 minuti. Dopo ogni centrifuga si rimuove il surnatante; il pellet rimanente, formato da LMMP

d'interesse, viene risospeso in 10 mL di RPMI in presenza o meno di Aciclovir a seconda che si tratti rispettivamente di HSV-1_{4weeks} o topo CTR. Eseguita l'ultima centrifuga, si aggiungono 1800 µL di Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco) e 200 µL di collagenasi e ialuronidasi (1000 U/mL) (StemCell Technologies), enzimi che favoriscono il processo di digestione della matrice extracellulare e del tessuto connettivo. La digestione viene effettuata in un bagnetto termostato a 37°C per 20 minuti, agitando energicamente ogni 5 minuti; l'aumento della torbidità della soluzione è indice di avvenuta digestione tissutale. Terminata la digestione si effettua una centrifuga a 1800 rpm, a 4°C per 8 minuti; si rimuove il surnatante e si aggiungono 3 mL di terreno RPMI con o senza Aciclovir a seconda che si tratti rispettivamente di topo HSV-1_{4weeks} o topo CTR. Si procede con la filtrazione, processo che consente di eliminare frammenti di tessuto non digerito e viene eseguita utilizzando un *Mesh Filter* sterile, con pori del diametro di 100 µm. Si esegue poi una ulteriore centrifuga a 1600 rpm, a 4°C per 5 minuti. Si rimuove il surnatante e il precipitato viene risospeso nel terreno completo per la coltura di cellule gliali. Il terreno completo è costituito da:

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): 90% (Gibco)
- FBS (Fetal Bovine Serum): 10% (Gibco)
- AA 1X (anti-anti): 1% (Gibco)
- Gentamicina: 20 µg/mL (Hospira)
- GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor): 10ng/mL (ImmunoTools)
- L-Glutamina: 2mM (Gibco)

Infine, si seminano 150 µL della sospensione cellulare al centro del vetrino di ogni pozzetto della piastra (precedentemente rivestito con poli-D-lisina e laminina, come riportato nel paragrafo "Coating di vetrini con poli-D-lisina e laminina"). Le piastre vengono mantenute in incubatore in un ambiente controllato alla temperatura di 37°C, al 95% di umidità e al 5% di CO₂. Il giorno seguente si aggiungono 850 µL di terreno completo in ogni pozzetto. Trascorse 24 ore si rimuove il terreno e si aggiunge 1 mL di terreno completo fresco in ogni pozzetto; il pozzetto viene cambiato a giorni alterni fino al raggiungimento del decimo giorno dalla semina. Trascorsi 10 giorni in coltura è chiaramente visibile

la morfologia caratteristica delle cellule gliali al microscopio (morfologia stellata con un corpo cellulare da cui dipartono numerosi prolungamenti) e si può procedere con i successivi esperimenti di interesse.

4.6 Colorazione delle cellule gliali in coltura con Ematossilina e Eosina

La colorazione Ematossilina e Eosina è la più comune colorazione utilizzata nel campo dell'istologia e consiste in una doppia colorazione per ricercare determinati componenti dei tessuti:

- L'ematossilina è un colorante basico che colora in blu-violetto i componenti cellulari carichi negativamente, come acidi nucleici, proteine di membrana e membrane cellulari. Questi componenti sono presenti a livello del nucleo, che assume pertanto il colore blu.
- L'eosina è un colorante acido che colora di rosso-rosa i componenti carichi positivamente, come proteine cellulari e proteine mitocondriali. Le rimanenti zone cellulari e il citoplasma si colorano quindi di rosa.

In breve, si rimuove il terreno di coltura, si eseguono 3 lavaggi in PBS 1X di 10 minuti ciascuno e si fissano le cellule con paraformaldeide 4% (PFA) per 20 minuti. Si eseguono poi ulteriori 3 lavaggi in PBS 1X e 1 lavaggio con H₂O deionizzata. Si aggiunge ematossilina fino a ricoprire il vetrino; trascorsi 10 minuti si eseguono lavaggi ripetuti in H₂O deionizzata fino alla completa rimozione del colore. Successivamente, si aggiunge eosina fino a ricoprire il vetrino; trascorsi 2 minuti si eseguono ripetuti lavaggi con H₂O deionizzata fino alla rimozione del colore. I vetrini trattati vengono montati su vetrini porta-oggetto in presenza di una goccia di mounting media composto da Glicerolo 90% in PBS 10x e analizzati al microscopio ottico.

4.7 Immunofluorescenza di cellule gliali enteriche

L'immunofluorescenza è un'importante tecnica immunochimica che consente il rilevamento e la localizzazione di antigeni in diversi tessuti e/o cellule, grazie all'utilizzo di anticorpi specifici coniugati con fluorofori. Esistono due metodi di immunofluorescenza:

- il metodo diretto (primario): il fluoroforo è coniugato direttamente all'anticorpo primario che reagirà in seguito con la molecola bersaglio.
- il metodo indiretto (secondario): l'anticorpo primario si lega alla molecola bersaglio; un anticorpo secondario marcato con fluoroforo riconosce e si lega all'anticorpo primario. Tra i fluorofori più utilizzati troviamo l'isotiocianato difluoresceina (FITC) che emette nel giallo-verde e l'isotiocianato di tetrametilrodamina (TRITC) che emette nell'arancio-rosso.

Si realizza così una reazione immunitaria antigene-anticorpo e, dove è presente l'antigene di interesse, la fluorescenza viene rilevata mediante microscopio confocale a fluorescenza.¹⁴⁴

In questo progetto di tesi, la tecnica dell'immunofluorescenza è stata utilizzata per caratterizzare la coltura di cellule gliali, precedentemente allestite a partire da LMMP di ileo di topo CTR. In particolare, si andrà a valutare la presenza di GFAP, marcatore specifico di cellule gliali.

Dopo 10 giorni dalla semina, si rimuove il terreno completo alle colture gliali e si eseguono 3 lavaggi in PBS 1X per rimuovere residui di terreno e detriti cellulari non adesi al vetrino. Le cellule adese ai vetrini vengono fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti a temperatura ambiente. La fissazione è un passo fondamentale dell'immunofluorescenza in quanto permette di immobilizzare gli antigeni bersaglio senza modificare l'architettura cellulare e inoltre consente agli anticorpi il massimo accesso a qualsiasi componente cellulare. In particolare, la paraformaldeide forma legami crociati di metilene intra e intermolecolari. Dopo la fissazione si eseguono 3 lavaggi in PBS 1X (1

mL/pozzetto) di 5 minuti ciascuno e si aggiunge 1 mL di NH_4Cl [Carlo Erba] 0,05M per ridurre l'auto-fluorescenza del fissativo. Al termine di questa incubazione di 10 minuti, si eseguono altri 3 lavaggi in PBS 1X di 10 minuti ciascuno. Si procede poi con la fase di blocco che consiste in un'incubazione di 30 minuti con una soluzione di PBS/BSA 2% TRITON 0,2% (Sigma Aldrich): è una soluzione al 2% di albumina sierica bovina, utilizzata per saturare i siti di legame proteici in eccesso sulle membrane e bloccare così i siti reattivi non specifici a cui gli anticorpi secondari potrebbero legarsi. Il Triton invece è un tensioattivo non ionico che aumenta la permeabilità della membrana citoplasmatica per facilitare la penetrazione degli anticorpi diretti verso gli antigeni citoplasmatici. In seguito, si procede con l'aggiunta dell'anticorpo primario (100 μL /vetrino), precedentemente diluito nella soluzione di PBS/BSA 2% Triton 0,2% e si lascia incubare per 16 ore a 4°C al buio. (**Tabella 2**) Nella scelta degli anticorpi devono essere presi in considerazione diversi criteri: per evitare che l'anticorpo secondario reagisca in modo incrociato con immunoglobuline endogene nel campione di tessuto, l'anticorpo primario deve derivare da una specie diversa da quella del campione. Di conseguenza, l'anticorpo secondario deve essere contro la specie ospite dell'anticorpo primario. Trascorse le 16 ore di incubazione, si eseguono 3 lavaggi in PBS 1X di 10 minuti ciascuno, necessari per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario non legato. Si procede con l'aggiunta dell'anticorpo secondario (100 μL /vetrino), precedentemente diluito in PBS/BSA 2% Triton 0,2% e si lascia incubare per 1 ora al buio a temperatura ambiente. L'anticorpo secondario, marcato con fluoroforo, riconosce e si lega alla porzione costante dell'anticorpo primario per consentire la rilevazione della fluorescenza. Infine, si eseguono 3 lavaggi di 10 minuti in PBS 1X, in modo da rimuovere l'eccesso di anticorpo secondario. I vetrini trattati vengono montati su vetrini porta-oggetto in presenza di una goccia di Fluor SaveTM Reagent (Millipore), un mezzo di montaggio acquoso che permette il mantenimento della fluorescenza del campione. I vetrini vengono conservati a 4°C al buio fino al momento dell'analisi al microscopio confocale a fluorescenza.

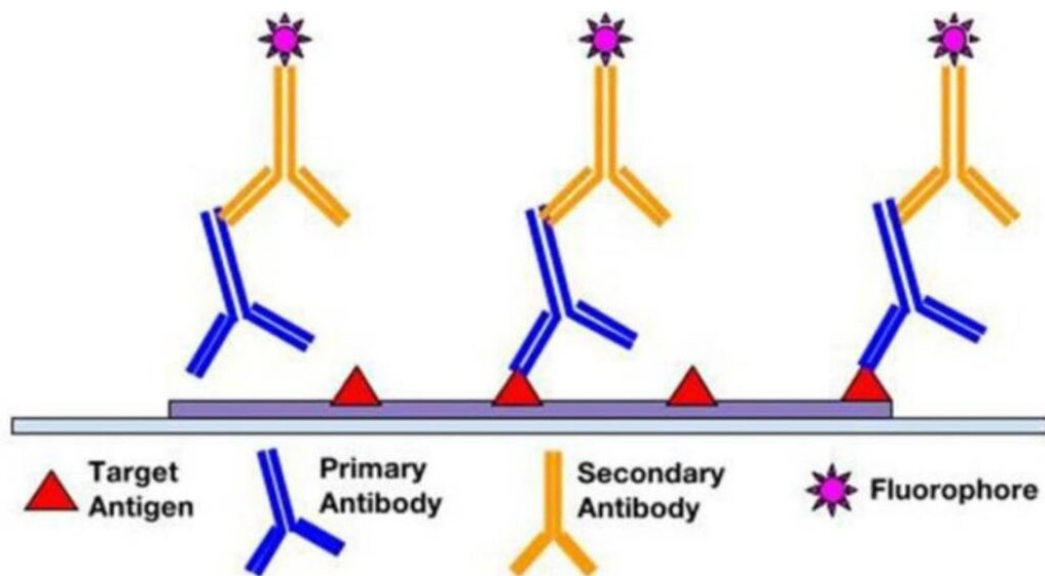


Figura 29: Schema rappresentativo del legame tra antigene e anticorpo: l'anticorpo primario si lega alla molecola bersaglio; un anticorpo secondario marcato con fluoroforo riconosce e si lega l'anticorpo primario.

Tabella 2: Anticorpi prima e secondari utilizzati in immunofluorescenza.

Anticorpo	Tipologia	Ditta	Specie	Diluizione
Anti-gliale fibrillare acido proteico, clone GA5	Primario	Millipore	Mouse	1:200
S100b - sc-136061	Primario	SantaCruz Biotechnology	Mouse	1:200
TLR2 (H-175) sc-10739	Primario	SantaCruz Biotechnology	Rabbit	1:200
TLR4 (H-80) sc-10741	Primario	SantaCruz Biotechnology	Rabbit	1:200
Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Secondario coniugato Alexa Fluor® 647nm	Invitrogen	Goat	1:200

Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 A-21244				
Cy™3 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Secondario coniugato Cy3 (594nm)	Jackson ImmunoResearch	Goat	1:200

4.8 Estrazione dell'RNA da cellule gliali enteriche in coltura

Trascorsi 10 giorni dall'isolamento delle cellule gliali si procede con la raccolta delle cellule al fine di eseguire in seguito l'estrazione dell'RNA, utilizzando un kit apposito (E.Z.N.A TOTAL RNA KIT I). Questo kit fornisce un metodo semplice e rapido per l'isolamento fino a 100 µg di RNA totale da cellule eucariotiche e tessuti molli in coltura. La base di questo sistema è l'utilizzo delle proprietà leganti reversibili della matrice Hi-Bind a cui l'RNA può legarsi e la successiva rimozione di detriti cellulari e alti contaminanti in seguito a lavaggi. L'RNA di alta qualità viene infine eluito in acqua priva di nucleasi.

Inizialmente, si rimuove il terreno di coltura in ogni pozzetto e si eseguono tre lavaggi in PBS 1X. Dopo il terzo lavaggio si rimuove il PBS 1X dal primo pozzetto e si aggiungono 350 µL di buffer di lisi (TRK) addizionato di beta-mercaptoetanolo³; pertanto, questa e tutte le operazioni descritte in seguito si

³ Il Beta-mercaptoetanolo è un potente agente riducente che viene aggiunto al tampone di lisi per denaturare irreversibilmente le RNAasi, enzimi estremamente stabili e attivi che degradano l'RNA; tali enzimi vengono rilasciati in seguito alla lisi cellulare, necessaria per l'isolamento dell'RNA, e devono essere rapidamente inattivati per ottenere RNA di alta qualità. Il Beta-mercaptoetanolo permette quindi la disattivazione delle RNAasi attraverso la riduzione dei

eseguono in cappa chimica. Si utilizza un *cell scraper*, un dispositivo sterile a manico lungo con testa angolata e smussata progettato per grattare il vetrino e permettere la raccolta di cellule da colture cellulari. Al fine di avere una buona quantità di cellule di partenza e ottimizzare l'estrazione di RNA, si uniscono due pozzetti di una piastra 6-wells in un unico campione e si procede direttamente con l'estrazione di RNA o, in alternativa, il campione può essere conservato a -80°C fino al momento dell'estrazione. L'estrazione dell'RNA è una tecnica che permette la purificazione dell'RNA da campioni biologici. È stata eseguita a partire da cellule gliali precedentemente isolate da LMMP murino. Tutte le operazioni descritte in seguito si eseguono in cappa chimica e si utilizza il kit E.Z.N.A TOTAL RNA KIT I, seguendo le indicazioni del produttore.

Inizialmente si aggiungono 350 µL di etanolo al 70% in ogni campione, costituito da cellule gliali raccolte in buffer di lisi, e si vortexa; in seguito, i 700 µL totali di campione vengono trasferiti in una HiBind RNA Mini Column, che ha la capacità di legare l'RNA, a sua volta inserita in un Collection Tube da 2 mL. Si esegue una centrifuga a 13000 rpm per 1 minuto e l'eluato viene scartato; tale operazione viene ripetuta una seconda volta. Dopo aver aggiunto 250 µL di RNA Wash Buffer I, si centrifuga la colonnina a 13000 rpm per 1 minuto e si scarta nuovamente l'eluato. Successivamente si aggiungono 75 µL di DNA I stock solution (73.5 µL DNA I Digestion Buffer + 1,5 µL di enzima DNase I⁴), direttamente sulla superficie della membrana della HiBind RNA Mini Column, e si lascia incubare a temperatura ambiente per 15 minuti. Dopo aver aggiunto 250 µL di RNA Wash Buffer I e aver lasciato incubare a temperatura ambiente per 2 minuti, si centrifuga la colonnina a 13000 rpm per 1 minuto e si rimuove l'eluato. Si ripete la stessa operazione due volte di seguito, aggiungendo alla colonnina 500 µL di RNA Wash Buffer II diluito con etanolo 100%, centrifugando a 13000 rpm per 1 minuto e si rimuove l'eluato. A questo punto è necessario eseguire una centrifuga a vuoto a 13000 rpm per 5 minuti per eliminare eventuali tracce di

legami disolfuro e la distruzione della conformazione nativa richiesta per la funzionalità enzimatica.

⁴ La DNase I è un endonucleasi che digerisce il DNA a singolo e a doppio filamento, idrolizzando i legami fosfodiesteri e producendo mono e oligodesossiribonucleotidi con gruppi 5'-fosfato e 3'-OH-. Permette quindi la rimozione di DNA genomico contaminante da campioni di RNA.

etanolo. Si trasferisce la HiBind RNA Mini Column in una eppendorf da 1,5 mL e si aggiungono 70 μL di Nuclease-free Water; si esegue un'ultima centrifuga a 13000 rpm, al termine della quale si otterrà l'RNA di interesse. Infine si procede con la quantificazione del RNA utilizzando lo strumento NanoDrop (NanoDrop OneC – UV-Vis Spectrophotometer- Witec AG), uno spettrofotometro che, a partire dalla misura dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 260 nm, restituisce la concentrazione di RNA nel campione di interesse in ng/ μL .

4.9 Real-time PCR

La Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di biologia molecolare che consente di quantificare l'espressione di un gene a partire da mRNA (RNA messaggero) estratto dal campione di interesse.

Il primo step prevede una reazione di retro-trascrizione, che consiste nella sintesi di una molecola di DNA a doppio filamento (cDNA, DNA complementare) a partire da una molecola di RNA, utilizzando l'enzima trascrittasi inversa (RT). Il cDNA viene successivamente amplificato mediante reazioni a catena della DNA polimerasi (PCR), a partire da due oligonucleotidi a singolo filamento (primer gene-specifici) che fungono da innesco per l'attività dell'enzima Taq Polimerasi. Ogni reazione PCR è caratterizzata dal susseguirsi di tre step successivi:

- Denaturazione: la doppia elica di DNA si separa e si ottengono due singoli filamenti complementari tra loro.
- Annealing: i primer gene-specifici si appaiano al rispettivo singolo filamento di DNA
- Estensione: l'enzima Taq Polimerasi sintetizza il filamento complementare esclusivamente in direzione 5'-3'; andando a ricostituire la doppia elica di DNA.

In breve, in seguito all'appaiamento del primer *forward* all'estremità 3' del filamento antisenso (con orientamento 3'-5'), l'enzima procederà a sintetizzare il filamento complementare a quest'ultimo; allo stesso modo, la sintesi del filamento

antisenso avverrà in seguito all'appaiamento del primer *reverse* all'estremità 3' del filamento senso (5'-3').

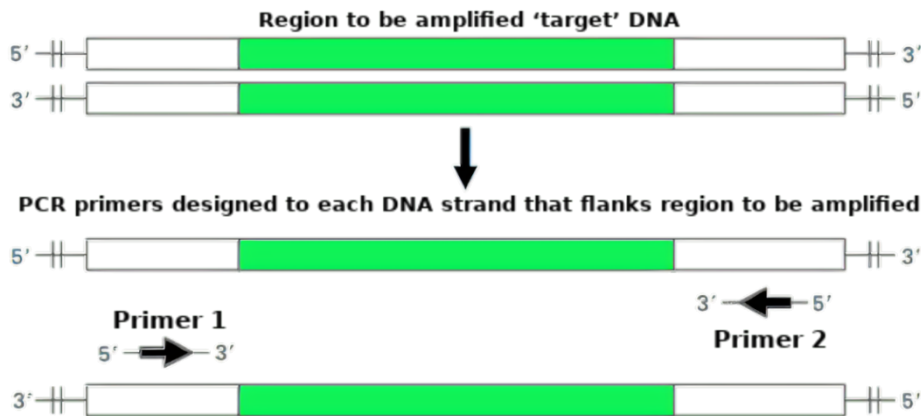


Figura 30: Rappresentazione della fase di "Annealing" della Real Time PCR: appaiamento del primer forward all'estremità 3' del filamento antisenso e appaiamento del primer reverse all'estremità 3' del filamento senso

La quantità di DNA così prodotta viene monitorata nel corso dei vari cicli di reazione, andando a misurare la fluorescenza prodotta da coloranti introdotti nella reazione (nello specifico intercalanti del DNA) e tale segnale di fluorescenza è proporzionale alla quantità di prodotto formato. Viene in seguito registrato il numero di cicli di amplificazione necessari per ottenere un determinato segnale di fluorescenza (Ct, ciclo soglia), corrispondente quindi ad una determinata quantità di molecole di DNA; è quindi possibile confrontare i Ct ottenuti da campioni diversi al fine di valutare l'espressione di un gene di interesse.¹⁴⁵

La Real Time PCR è una tecnica caratterizzata da elevata sensibilità e specificità: sensibilità perché si parte da una quantità molto piccola di DNA o RNA che contiene la sequenza di interesse, e specificità perché si amplifica solamente il gene d'interesse.

Uno dei parametri più importanti della PCR in tempo reale, è una buona

progettazione dei primer:

- Lunghezza dell'amplicone di circa 80-250 paia di basi
- Concentrazione dei primer comprese tra 50 e 500 nM
- Lunghezza dei primer di 18-24 nucleotidi e specifici per la sequenza target
- Coppie di primer con temperatura di melting compatibili (entro 5°C)
- Contenere almeno il 50 % di GC per formare ibridi imperfetti stabili

In questo specifico progetto di tesi, abbiamo utilizzato questa tecnica per valutare se alcuni geni di interesse (riportati in tabella con le relative sequenze primer) sono up o down-regolati nel campione HSV-1_{4weeks} rispetto al campione CTR. I geni sono stati selezionati dall'articolo di Orre (riportati in seguito, le secretasi perché è noto in letteratura che hanno un ruolo nello sviluppo dell'AD e TLR2, TLR4 e Cd14 per validare il risultato ottenuto al FACS da LMMP.

I geni selezionati dall'articolo di Orre sono i seguenti:

- 5 geni più up-regolati
- Geni up-regolati (fold change > 5.5) d'interesse in quanto sono coinvolti in: *Positive regulation of immune system process, Defense response, innate immune response, Cytokine activity*
- 5 geni più down-regolati
- Geni down-regolati (fold change > -3.2) d'interesse in quanto coinvolti in: *Regulation of neuron differentiation, Regulation of synaptic transmission; Regulation of neurogenesis, Neuron Differentiation, Neuron development*

Tabella 3: Geni utilizzati nella Real time PCR con le relative sequenze primer

Gene	Primer Fwd	Primer Rev
Ly86	5' AGCTGCCCTCCTTGTGTGGA 3'	5' CAAGCCCCACTGTTGCAGG 3'
Serping1	5' AGTCCTGGGCCAGACAGTG 3'	5' GCAGGTGCAGAAGGCAGGC 3'
CD40	5' TGTCTTTGCCTCGGCTGTGC 3'	5' GGCTTCCTGGCTGGCACAAA 3'
Cxcl1	5' GCTGTCAGTGCCTGCAGACC 3'	5' GCAAGCCTCGCGACCATTCT 3'
Cxcl10	5' TCCTGCTGGGTCTGAGTGGG 3'	5' GCAGGATAGGCTCGCAGGGA 3'

IL34	5' GCCCAAAGCCTTGCTGGACA 3'	5' ACTGTGGGGATGGAGCCTGG 3'
Ccl5	5' CTCGGACACCACTCCCTGCT 3'	5' GCACACACTTGGCGGTTCCCT 3'
Ccl6	5' GTGCATCAAGCCGGGCATCA 3'	5' ACTCTCCGATCGCTGGGGTC 3'
Hes5	5' TGGCGGTGGAGATGCTCAGT 3'	5' TGCTGCTGTTGATGCGGTCC 3'
Amer2	5' CTGGCGATCAAAGCTCCCGG 3'	5' GTCTTGGACGCATCCTCGGC 3'
CD14	5' GAGTTGTGACTGGCCCAGTCAGC 3'	5' GCAAAAGCCAGAGTTCCTGAC 3'
Ccl3	5' TGCAGAGGACTCTGAGACAGG 3'	5' GAGTGGTGTCCGAGCCATA 3'
Gdp1	5' CATGAGCGTGCTGATGGGGG 3'	5' GCAGCCGATGGTCGTCTCAC 3'
Igfbp2	5' TGAAGGCGCTTGTACAGGC 3'	5' TGGTTCTCCACCAGGCCTCC 3'
Sc4mol	5' CCATCGATGTGCACAGCGGT 3'	5' GTGCCGAGCGCCCGTATAAA 3'
S100b	5' GGCGAGAGGGTGACAAGCAC 3'	5' TCCCCATCTTCGTCCAGCGT 3'
Ccl4	5' TGCCTTCTGTGCTCCAGGGT 3'	5' CCACAGCTGGCTTGAGCAA 3'
Il1b	5' GGCTGTGGAGAAGCTGTGGC 3'	5' ACGTCACACACCAGCAGGTT 3'
Clec7a	5' GCTGGGTGCCCTAGGTGAGT 3'	5' TGGGATGCCTTGGAGGGAGC 3'
Tyrobp	5' GAGCCCTCCTGGTGCCTTCT 3'	5' CACTCTGGGCCTGTACGGGA 3'
Trem2	5' TCGAGTTTCGAGGGTGCCCA 3'	5' AACGCAGGCCAGGAGGAGAA 3'
C1s	5' ACATTGCCCTGGTGCAGCTG 3'	5' CCCCATGTCACCCGGTGAGA 3'
Myd88	5' GTGTGTGTCGACCGTGACG 3'	5' ACCATGCGGCGACACCTTTT 3'
Cst7	5' TTCTGCTTGCCTCTGCTGC 3'	5' GCGGCCTTAAGCACTCCTGG 3'
TLR2	5' GGTGCGGACTGTTTCCTTCT 3'	5' GAGCCAAAGAGCTCGTAGCA 3'
TLR4	5' CTGATCCATGCATTGGTAGGT 3'	5' GGACTCTGATCATGGCACTG 3'
ADAM10	5' GGAAGAAATGCAAGCTGAA 3'	5' CTGTACAGCAGGGTCCTTGAC 3'
BACE-1	5' CCCTTTCCTGCATCGCTAC 3'	5' TACACACCCTTTCGGAGGTC 3'
PSEN-1	5' GGCTCATCTTGGCTGTGATT 3'	5' GTGGGCCTTGGGACATAA 3'

Il procedimento utilizzato in questa tesi prevede la preparazione, in apposita cappa PCR [UVC/T-M-AR DNA/RNA UV- cleaner box-bioSan], di una mix con i seguenti reagenti:

- I Taq Syber [iTaq Universal Probes One-Step Kit-BIO_RAD]: colorante intercalante che emette fluorescenza quando legato alla doppia elica del DNA. l'intensità del segnale è proporzionale alla concentrazione del DNA.

Contiene inoltre la Taq DNA polimerasi e MgCl. Si utilizzano 5 μ L per campione.

- I Script Reverse Transcriptase [iTaq Universal Probes One-Step Kit-BIO_RAD]: trascrittasi inversa, enzima che permette la reazione di retro-trascrizione, e una miscela di inibitori delle RNAsi, per prevenire la degradazione dell'RNA durante la reazione. Si utilizzano 0,125 μ L per campione.
- Pf: primer forward, diluito 1:10 dalla soluzione madre. Si utilizzano 0,3 μ L per campione.
- Pr: primer reverse, diluito 1:10 dalla soluzione madre. Si utilizzano 0,3 μ L per campione.
- Nuclease-Free Water [iTaq Universal Probes One-Step Kit-BIO_RAD]: si utilizzano 4,275 μ L per campione.

Successivamente si aggiungono 10 μ L della mix in ogni pozzetto della piastra per PCR, 2 μ L di campione e, per avere un controllo negativo, 2 μ L di Nuclease-Free Water. Si ricopre infine la piastra con adesivo trasparente e la si pone all'interno del termociclatore (Thermal Cyclers PCR), uno strumento che consente di far avvenire ogni step della reazione ad una temperatura ben precisa:

- Retro-trascrizione: 50°C, 2 minuti, 1 ciclo;
- Attivazione della polimerasi e denaturazione del DNA: 95°C, 10 minuti, 1 ciclo;
- Denaturazione: 95°C, 15 secondi, 40 cicli;
- Amplificazione, ovvero annealing ed estensione: 95°C, 1 minuto, 40 cicli.

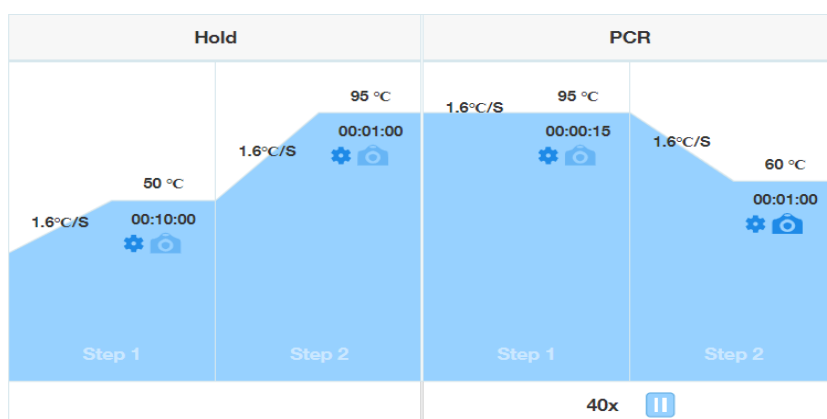


Figura 31: Step della reazione PCR con le relative temperature in °C

4.10 Whole Mount di ileo murino in combinazione con immunofluorescenza

La Whole Mount è una tecnica che permette di analizzare l'espressione genica all'interno di un organismo; nel nostro progetto di tesi, abbiamo analizzato l'ileo murino precedentemente fissato con formaldeide per ricercare, con anticorpi la marcatura data da S100b nel topo CTR rispetto al topo HSV-1_{4weeks}. Dopo l'apertura della cavità addominale del topo, è stato prelevato il tratto distale dell'ileo ed il lume intestinale è stato sottoposto a lavaggi con PBS 1X. I tessuti sono stati in seguito fissati in una soluzione di PFA (para-formaldeide) al 4% per 1 ora a 22°C. Terminata l'incubazione, l'intestino è stato lavato con PBS 1X per tre volte (10 minuti per ciascun lavaggio), tagliato in segmenti che sono stati conservati in PBS 1X e NaN₃, a 4°C fino all'utilizzo.

In breve, si taglia l'ileo in segmenti di 1 cm i quali vengono distesi su supporto rigido di uno stereomicroscopio, bagnato precedentemente con PBS-Triton 0,2%, in modo da non far seccare il tessuto. Si rimuove con il bisturi il tessuto adiposo e, per aprire il lume, si incide in un lato; si stende la mucosa verso l'alto e si rimuovono i villi intestinali, applicando una leggera pressione con una pinzetta. In seguito, si deposita l'ileo con la mucosa verso il basso e la sierosa verso l'alto, si incide un lato del tessuto e si solleva l' LMMP; successivamente lo si distende su supporti di silicone e lo si fissa ai quattro angoli con spilli in modo da distendere il

più possibile il tessuto. Si eseguono 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno con PBS-Triton 0,2%, un tensioattivo non ionico che aumenta la permeabilità delle membrane per facilitare l'accesso degli anticorpi e la rivelazione di antigeni. Il tessuto viene in seguito incubato per 30 minuti in una soluzione di PBS-Triton 0,2% + BSA 2% in modo da ridurre il legame degli anticorpi secondari a siti non specifici. Terminata l'incubazione si aggiungono 100 µL di anticorpo primario, precedentemente diluito in PBS-Triton BSA 2% e si lascia incubare over-night al buio. Il giorno successivo, dopo aver eseguito 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno con PBS-Triton 0,2% per rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato, si aggiungono 100 µL di anticorpo secondario coniugato con fluorofori, precedentemente diluito in PBS-Triton 0,2% + BSA 2% e si lascia incubare per 1 ora al buio. Terminata l'incubazione si eseguono 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno con PBS-Triton 0,2%. Il tessuto infine viene montato su vetrini porta oggetto in presenza di una goccia di Fluor Save™ Reagent e conservato a 4°C al buio fino al momento dell'analisi al microscopio confocale a fluorescenza.

Tabella 4: Anticorpi primari e secondari utilizzati in Whole Mount

Anticorpo	Tipologia	Ditta	Specie	Diluizione
S100b - sc-136061	Primario	SantaCruz Biotechnology	Mouse	1:200
Cy™3 AffiniPure Goat Anti- Mouse IgG (H+L)	Secondario coniugato Cy3 (594nm)	Jackson ImmunoResearch	Goat	1:200

5.RISULTATI

5.1 Le cellule della glia enterica mostrano un fenotipo attivato con analisi citofluorimetrica

Al fine di valutare in modo preliminare l'effetto dell'infezione da HSV-1 a varie tempistiche (HSV-1_{4weeks}, HSV-1_{6weeks}, HSV-1_{8weeks} e HSV-1_{10weeks}) sull'attivazione della glia enterica, abbiamo eseguito un'analisi citofluorimetrica sulle cellule della glia enterica contenute nel LMMP di ileo di topo. Ogni campione viene sottoposto ad una doppia marcatura, utilizzando un anticorpo per GFAP ((Glial Fibrillary Acid Protein, proteina acida fibrillare gliale), marcatore specifico delle cellule della glia ed un anticorpo specifico che riconosce i marcatori della risposta immunitaria (IFN γ , CD14, QA2, S100 β , TLR2 e TLR4). Per ogni campione, l'analisi citofluorimetrica restituisce la percentuale di cellule derivanti da LMMP che risultano positive a GFAP ed ai diversi marcatori, sia nel topo controllo che nei topi sacrificati alle diverse tempistiche post-infezione.

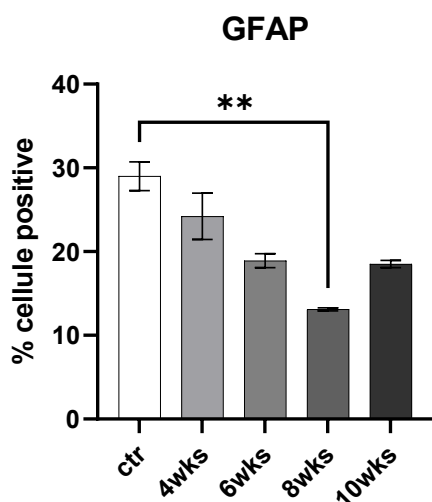


Figura 32: Analisi citofluorimetrica di LMMP per GFAP. L'istogramma riporta la percentuale di cellule GFAP+ derivanti da LMMP di topo CTR e di topi sottoposti ad infezione da HSV-1 a varie tempistiche (HSV-1_{4weeks}, HSV-1_{6weeks}, HSV-1_{8weeks}, HSV-1_{10weeks}). Per ogni campione sono stati analizzati 3 replicati biologici; per ogni replicato sono stati analizzati al FACS 10000 eventi. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test non parametrico Kruskal-Wallis, con multiple comparison di ogni campione rispetto al controllo non infetto (CTR). Sono riportati i seguenti livelli di significatività: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001

Il grafico in **Figura 32** mostra, per ogni campione la percentuale media di cellule che risultano essere GFAP+; in altre parole, essendo GFAP un marcatore specifico per l'identificazione delle cellule gliali, i dati indicano quante cellule della glia sono presenti sul totale di cellule che compongono il LMMP in analisi. Come si può osservare dai dati, in tutti i campioni viene rilevata una percentuale di cellule GFAP+ inferiore al 30%: l'LMMP, infatti, è costituito da varie tipologie cellulari, tra cui prevalentemente fibre muscolari e neuroni enterici. In particolare, la percentuale di cellule GFAP+ risulta essere circa del 30% nel topo CTR, mentre vi è una progressiva diminuzione all'aumentare della durata dell'infezione da HSV-1. Tuttavia la differenza rispetto al topo CTR risulta essere significativa solo per il topo HSV-1_{8weeks} con una riduzione di circa il 50% delle cellule GFAP+.

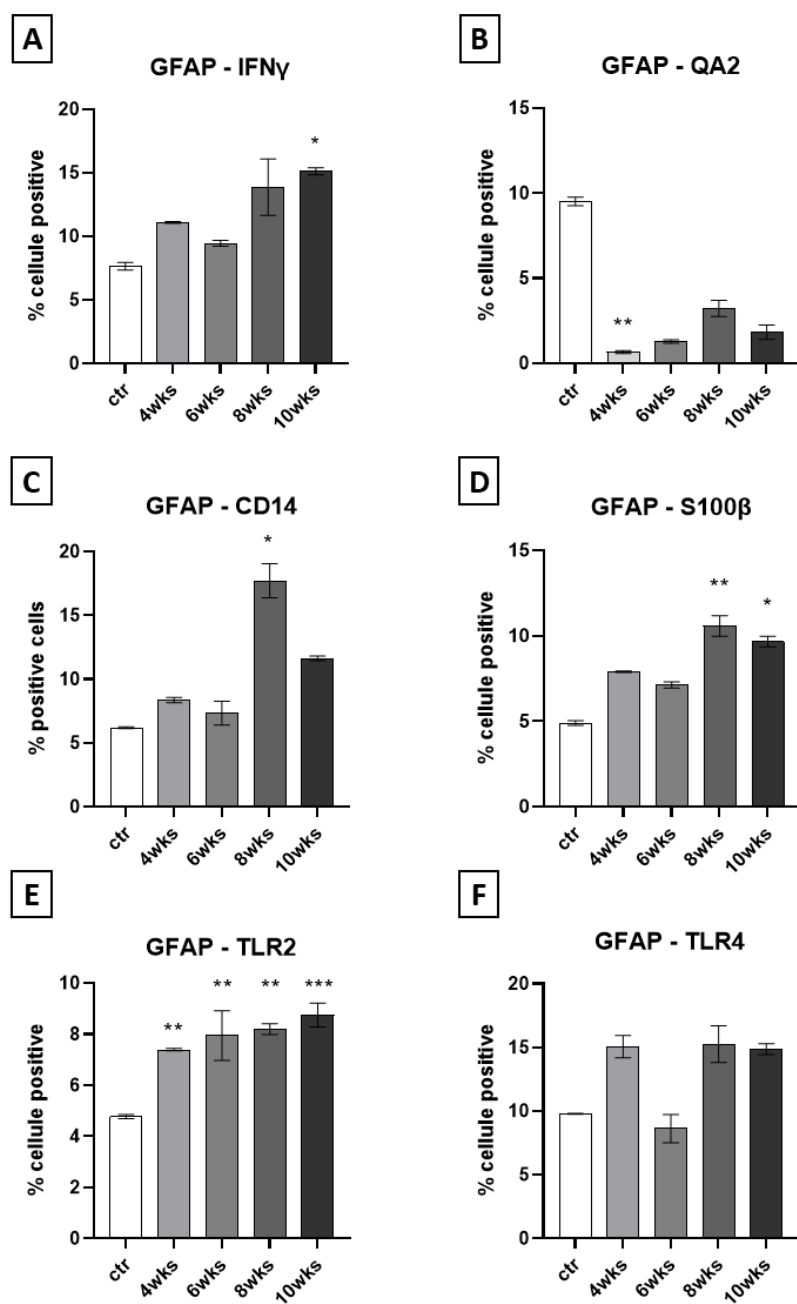


Figura 33: Analisi citofluorimetrica di EGC nell'LMMP. Percentuale di cellule derivanti da LMMP di topo CTR e di topi sottoposti ad infezione da HSV-1 a varie tempistiche (*HSV-1*_{4weeks}, *HSV-1*_{6weeks}, *HSV-1*_{8weeks}, *HSV-1*_{10weeks}) che sono positive alla co-marcatore per GFAP e uno dei seguenti marcatori: A) IFN γ , B) QA2, C) CD14, D) S100 β , E) TLR2 e F) TLR4. Per ogni campione sono stati analizzati 3 replicati biologici; per ogni replicato sono stati analizzati al FACS 10000 eventi, dove per eventi si intende il numero di cellule. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test non parametrico Kruskal-Wallis, con multiple comparison di ogni campione rispetto a CTR. Sono riportati i seguenti livelli di significatività: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

IFN γ è una citochina pro-infiammatoria secreta da numerose tipologie cellulari,

comprese le cellule gliali. In **Figura 33-A** sono riportati i risultati relativi all'analisi citofluorimetrica delle cellule isolate dall'LMMP in seguito alla co-marcatura GFAP-IFN γ : la percentuale delle cellule positive ad entrambi i marcatori in CTR (7,5%) risulta essere inferiore a quella relativa ai topi infetti da HSV-1 ai vari time point. I dati indicano un aumento della percentuale di cellule GFAP+/IFN γ + all'aumentare della persistenza dell'infezione. L'aumento delle cellule è particolarmente evidente nella fase tardiva dell'infezione (15% in HSV-1_{10weeks}), con una differenza statisticamente significativa rispetto a CTR (con $P<0,05$). Questo ci suggerisce che la presenza di HSV-1 nei gangli enterici stimola il sistema immunitario, il quale, nel tentativo di eliminare l'infezione, può arrecare danno alle cellule del SNE, attraverso l'instaurarsi di uno stato infiammatorio cronico, probabilmente analogo a quello che si manifesta nel cervello durante le riattivazioni virali.

QA2 appartiene alla famiglia delle molecole MHC di classe I (*Major Histocompatibility Complex I*), coinvolto nel riconoscimento di cellule infettate da virus. Come si può osservare dalla **Figura 33-B**, sia il topo CTR che i topi infetti ai vari time point esprimono QA2. Tuttavia è evidente il trend di diminuzione della espressione nei topi infetti rispetto al controllo (CTR 10%). In particolare, la percentuale di cellule GFAP+/QA2+ risulta essere largamente inferiore al 5% nei topi HSV-1, con una differenza statisticamente significativa a quattro settimane (con $P<0,01$).

CD14 è una proteina che agisce come co-recettore insieme a TLR4 per mediare risposte immunitarie innate nell'infezione da HSV-1. Come si può osservare dalla **Figura 33-C**, nel campione CTR solo il 5% delle cellule è GFAP+/CD14+, percentuale che non varia nei topi HSV-1_{4weeks} e HSV-1_{6weeks}. È possibile invece apprezzare un aumento alle tempistiche successive: in particolare per i topi HSV-1_{8weeks} (17,5%), la cui differenza rispetto al CTR è statisticamente significativa (con $P<0,05$). All'aumentare della tempistica di infezione, quindi, aumenta l'espressione di cellule GFAP+/CD14+, che potrebbe suggerire un'attivazione del sistema immunitario per limitare la diffusione del virus.

S100 β è una proteina legante il Ca²⁺ ed è un marcatore specifico per l'identificazione di cellule gliali. Il grafico riportato in **Figura 33-D** indica che la percentuale di cellule GFAP+/S100 β + risulta essere aumentata nei topi infetti ai vari time point se confrontata con quella relativa alle cellule derivanti dal plesso mienterico del topo CTR. Infatti, solo il 5% delle cellule sono positive ad entrambi i marcatori nel topo CTR, percentuale che aumenta a quattro e sei settimane post-infezione da HSV-1; significativi sono invece i dati relativi al topo HSV-1_{8weeks} (12% con P<0,01) e HSV-1_{10weeks} (10% con P<0,05).

TLR2 è una glicoproteina transmembrana che appartiene alla famiglia dei recettori PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), in particolare alla famiglia dei *Toll-Like Receptor*: riconosce e lega i PAMPs (molecole prodotte dai microrganismi) e attiva così vie di trasduzione del segnale che possono stimolare processi immunitari implicati nell'infiammazione (ad esempio produzione di citochine pro-infiammatorie). Come si può osservare dalla **Figura 33-E**, la percentuale di cellule GFAP+/TLR2+ è aumentata rispetto al controllo nei topi infetti da HSV-1 a tutti i time point in analisi. Si può notare inoltre che l'espressione di TLR2 aumenta in modo progressivo all'aumentare della tempistica di infezione e che la differenza è statisticamente significativa in tutti i casi: CTR-HSV-1_{4weeks}, CTR-HSV-1_{6weeks} e CTR-HSV-1_{8weeks} con P<0,01 e CTR-HSV-1_{10weeks} con P<0,001. Questo ci suggerisce che all'aumentare della tempistica di infezione aumenta la percentuale di cellule GFAP+/TLR2+, necessarie per attivare vie di trasduzione del segnale che possono stimolare processi immunitari attraverso la produzione di citochine pro-infiammatorie.

TLR4 è un'altra proteina transmembrana che appartiene alla famiglia dei *Toll-Like Receptors*. Il suo coinvolgimento porta all'attivazione della via di segnalazione intracellulare di NF-KB, alla produzione di citochine pro-infiammatorie e al conseguente innesco di una risposta immunitaria di tipo innato. Dai dati riportati in **Figura 33-F** si può osservare un aumento di circa il 30% delle cellule GFAP+/TLR4+ nei topi infetti rispetto al topo CTR (ad eccezione del topo HSV-1_{6weeks}); tuttavia, questa differenza non è statisticamente significativa (P>0,05). Quindi, si può concludere che per TLR4 non c'è differenza di espressione nel topo CTR e nei topi sacrificati alle diverse tempistiche post-infezione.

Analizzando questi marcatori dell'immunità e dell'infiammazione, possiamo concludere che in LMMP di ileo si instaura una condizione di astrogliosi, ossia di attivazione e reattività della glia enterica. I dati più significativi li abbiamo rilevati, a seconda del marcatore, soprattutto a 8 e 10 settimane di infezione. All'aumentare della tempistica di infezione, aumenta l'attivazione della glia enterica che crea uno stato reattivo, caratterizzato dalla produzione di citochine pro-infiammatorie e al conseguente innesco di una risposta immunitaria di tipo innato.

5.2 Aumentata immuno-reattività per S100 β nelle cellule della glia enterica

In questo progetto di tesi, abbiamo utilizzato la tecnica Whole Mount per esaminare la distribuzione e morfologia delle cellule della EGC S100 β + nei gangli del plesso mienterico di topi CTR e topi HSV-1_{4weeks}, HSV-1_{6weeks}, HSV-1_{8weeks}. Questa tecnica ha il vantaggio che il tessuto fissato si mantiene morfologicamente identico alla condizione *in vivo*. La proteina β legante il calcio S100 è un marcatore specifico per l'identificazione di cellule gliali.

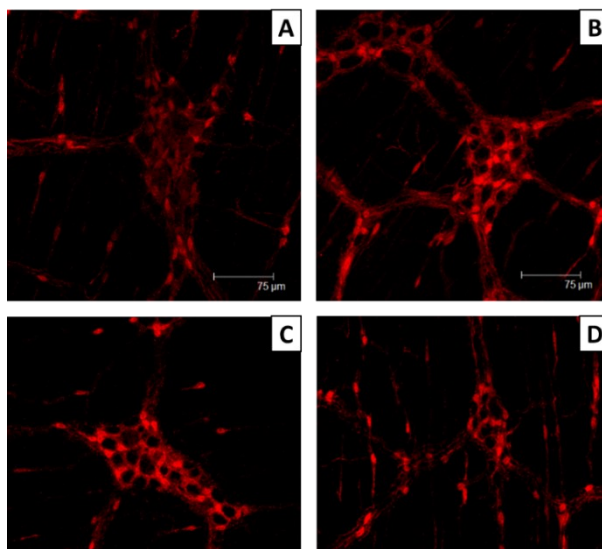


Figura 34: Immagini ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni Whole Mount (WM) di muscolatura longitudinale con annesso il plesso mienterico (LMMP) di ileo di topo CTR (A), topo HSV-1_{4weeks} (B), topo HSV-1_{6weeks} (C) e topo HSV-1_{8weeks} (D). L'LMMP è stato marcato con S100 β , marcatore di cellule gliali enteriche, in rosso. Barra=75 μ m

Analizzando al microscopio confocale a fluorescenza il plesso mienterico sia del topo CTR che del topo HSV-1_{4weeks}, si può osservare dalla **Figura 34** un aumento dell'intensità del segnale ed un aumento delle cellule nei gangli mienterici marcate con la proteina S100 β tra il topo CTR ed i topi sacrificati alle diverse tempistiche post-infezione. L'intensità del segnale di fluorescenza per S100 β ed il numero di cellule che esprimono S100 β aumentano all'aumentare del time point di infezione, con una maggiore intensità di segnale nel topo HSV-1_{8weeks}. Questi risultati confermano i dati ottenuti dall'analisi quantitativa al FACS, dove la percentuale di cellule gliali positive a S100 β , è risultata aumentata nel topo HSV-1_{4weeks}, HSV-1_{6weeks} e HSV-1_{8weeks} rispetto al topo CTR, con una differenza significativa tra topo CTR e topo HSV-1_{8weeks}. Quindi, se mettiamo a confronto i risultati per S100 β ottenuti al FACS e attraverso la tecnica Whole Mount, arriviamo alla stessa conclusione: all'aumentare del time point di infezione, aumenta la percentuale di cellule S100 β + e aumenta l'intensità del segnale di fluorescenza per S100 β . I dati più significativi si osservano, per entrambe le tecniche, nel topo HSV-1_{8weeks}.

5.3 Allestimento e caratterizzazione di colture primarie di EGC dal plesso mienterico murino

Dopo aver analizzato LMMP intero di ileo di topo, abbiamo messo a punto un protocollo di isolamento per le cellule della glia enterica, partendo da una tecnica di isolamento già validata per i neuroni. Trascorsi 10 giorni in coltura, è chiaramente visibile la morfologia caratteristica delle cellule gliali al microscopio ottico.

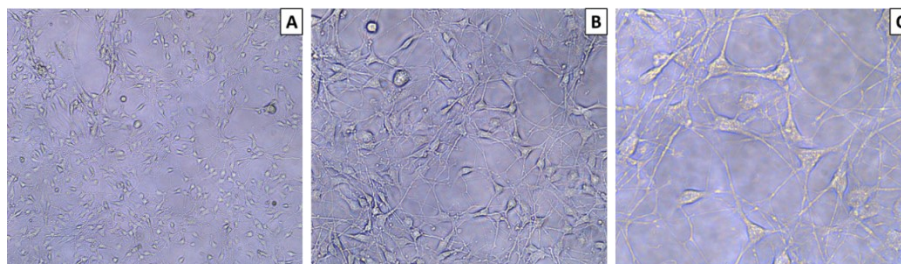


Figura 35: Coltura in adesione di cellule gliali enteriche isolate da LMMP di ileo di topo CTR. Immagine acquisite al microscopio ottico a diversi ingrandimenti: A) 10X, B) 20X, C) 40X.

Dalle immagini ottenute al microscopio ottico (**Figura 35**), è possibile osservare la peculiare morfologia delle cellule gliali enteriche. Dal punto di vista morfologico, le cellule gliali enteriche sono paragonabili agli astrociti del SNC: sono cellule di piccole dimensioni, con una forma di tipo stellato. Dal corpo cellulare dipartono lunghi e sottili prolungamenti, di numero variabile, che formano una struttura a rete con i prolungamenti di altre cellule gliali.

La colorazione Ematossilina e Eosina è la più comune colorazione utilizzata nel campo dell'istologia e consiste in una doppia colorazione per ricercare determinati componenti dei tessuti: come acidi nucleici, proteine di membrana, membrane cellulari, proteine cellulari e proteine mitocondriali.

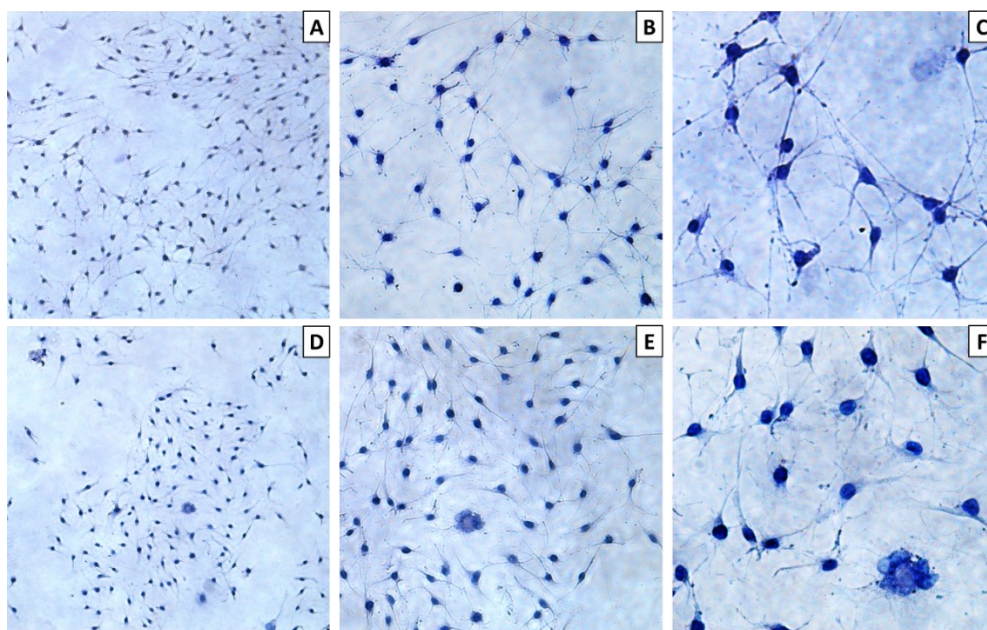


Figura 36: Colorazione con Ematossilina e Eosina di cellule gliali enteriche isolate da LMMP di ileo di topo. Immagini acquisite al microscopio ottico di due campi rappresentativi di un vetrino a diversi ingrandimenti: A-D) 10X, B-E) 20X, C-F) 40X.

Queste immagini, ottenute al microscopio ottico, permettono di apprezzare ulteriormente la morfologia delle cellule gliali enteriche isolate da LMMP di topo CTR, in seguito alla colorazione con Ematossilina ed Eosina. Si possono osservare piccole e numerose cellule a forma stellata, da cui dipartono lunghi e sottili prolungamenti. In particolare la colorazione con Ematossilina e Eosina consiste in

una doppia colorazione per ricercare componenti tissutali diversi: l'Ematossilina è un colorante basico che colora in blu-violetto i componenti cellulari carichi negativamente, come acidi nucleici, proteine di membrana e membrane cellulari. Questi componenti sono presenti a livello del nucleo, che assume pertanto il colore blu; l'Eosina è un colorante acido che colora di rosso-rosa i componenti carichi positivamente, come proteine cellulari e proteine mitocondriali. Le rimanenti zone cellulari e il citoplasma si colorano quindi di rosato. Come si può osservare dalla **Figura 36**, il colore predominante è il blu-violetto mentre il rosa è solo accennato poiché nei prolungamenti è presente poco citoplasma in proporzione alle proteine di membrana e membrane cellulari.

Per caratterizzare ulteriormente le culture di EGC ottenute abbiamo valutato l'espressione in immunofluorescenza di GFAP, per confermare la natura delle cellule e la purezza della cultura.

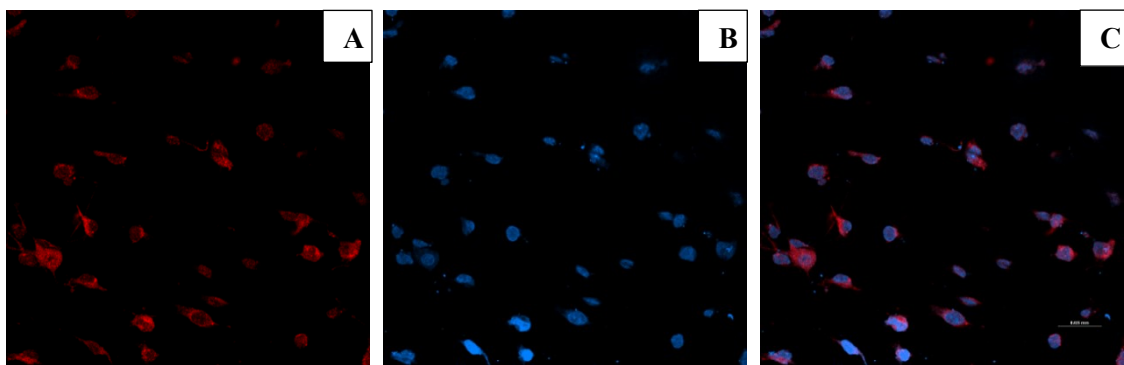


Figura 37: Immunofluorescenza di cellule gliali enteriche isolate da LMMP di ileo di topo CTR. Le immagini ottenute al microscopio confocale mostrano il segnale di fluorescenza relativo a: A) GFAP, marcatore specifico per le cellule della glia (in rosso); B) TOTO-3, marcatore dei nuclei (in blu); C) Merge, sovrapposizione dei due canali di fluorescenza. Barra 0,025nm

L'**immagine 37 A**, rappresenta il corpo cellulare delle cellule gliali enteriche, marcato con GFAP; l'**immagine 37 B** rappresenta i nuclei delle cellule, marcati con TOTO-3, un marcatore che lega in modo non specifico il DNA a doppio filamento di tutte le cellule. Dall'**immagine 37 C** si può osservare la sovrapposizione dei due canali di fluorescenza: i nuclei delle cellule (colore blu), marcati con TOTO-3, corrispondono alla marcatura con GFAP. Ne deduciamo che le uniche cellule in coltura sono cellule GFAP+ e quindi in questo caso cellule gliali enteriche isolate da LMMP: escludiamo così la presenza di altre tipologie

cellulari, come neuroni o fibre muscolari che sono presenti in LMMP. Attraverso la tecnica dell'immunofluorescenza quindi, abbiamo potuto valutare nel topo CTR l'espressione di GFAP per caratterizzare le cellule in coltura: risultato che conferma i dati ottenuti dall'analisi quantitativa al FACS, in cui abbiamo quantificato la percentuale di cellule GFAP+ (nel topo controllo era circa del 30%). Questo ci suggerisce che GFAP è un marcatore specifico per l'identificazione delle cellule gliali.

5.4 Analisi di espressione genica nelle CGE

I dati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica hanno suggerito l'attivazione della glia enterica, processo coinvolto nella neurodegenerazione. Pertanto, abbiamo deciso di analizzare nel nostro modello di infezione da HSV-1, il livello di espressione di alcuni geni che risultano significativamente modificati nelle cellule gliali ottenute in modelli di AD. In particolare sono stati selezionati geni che, nel lavoro di Orre et al., risultavano maggiormente sovra o sotto regolati negli astrociti del SNC in un modello murino di Alzheimer. Inoltre abbiamo analizzato l'espressione dei geni codificanti per le secretasi poiché sono enzimi coinvolti nella neurodegenerazione tipica dell'Alzheimer; e TLR2 e TLR4 per validare i risultati ottenuti al FACS. L'obiettivo era determinare, nell'ottica dell'ipotesi infettiva della malattia di Alzheimer, se l'infezione da HSV-1 nel sistema nervoso enterico, comporta alterazioni di espressione genica simile a quanto avviene negli astrociti nel SNC. Tutte le analisi sono state eseguite nel topo HSV-1_{4weeks} poiché dai dati raccolti al FACS a questo tempo di infezione erano già evidenti segni di attivazione della glia enterica.

Nel progetto di tesi, prima di valutare l'espressione dei geni d'interesse, li abbiamo suddivisi in base alla categoria funzionale a cui appartengono, utilizzando il Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/>): il programma analizza la lista di geni in input e restituisce una suddivisione basata, nel caso specifico, sull'appartenenza alla stessa classificazione funzionale o a specifici pathways biochimici. In base ai

risultati ottenuti, abbiamo individuato le seguenti categorie

1. Risposta infiammatoria (si suddivide a sua volta in):
 - Immunità innata: Clec7a, Cd14, Cd40, Ly86, Myd88, Tlr2, Tlr4
 - Citochine e chemochine: Ccl3, Ccl4, Ccl5, Ccl6, Cxcl1, Cxcl10, Il1b, Il34
 - Cascata del complemento: C1s, Serping1
2. Metabolismo: Sc4mol, Gpd1
3. Proteolisi di APP: ADAM10, BACE1, PSEN2
4. Altro: Cst7, Igfbp2, Trem2, Tyrobp, Hes5, Amer2, S100b

Abbiamo eseguito un'analisi in Real Time PCR per vedere la differenza di espressione di questi geni nella glia isolata da topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR.

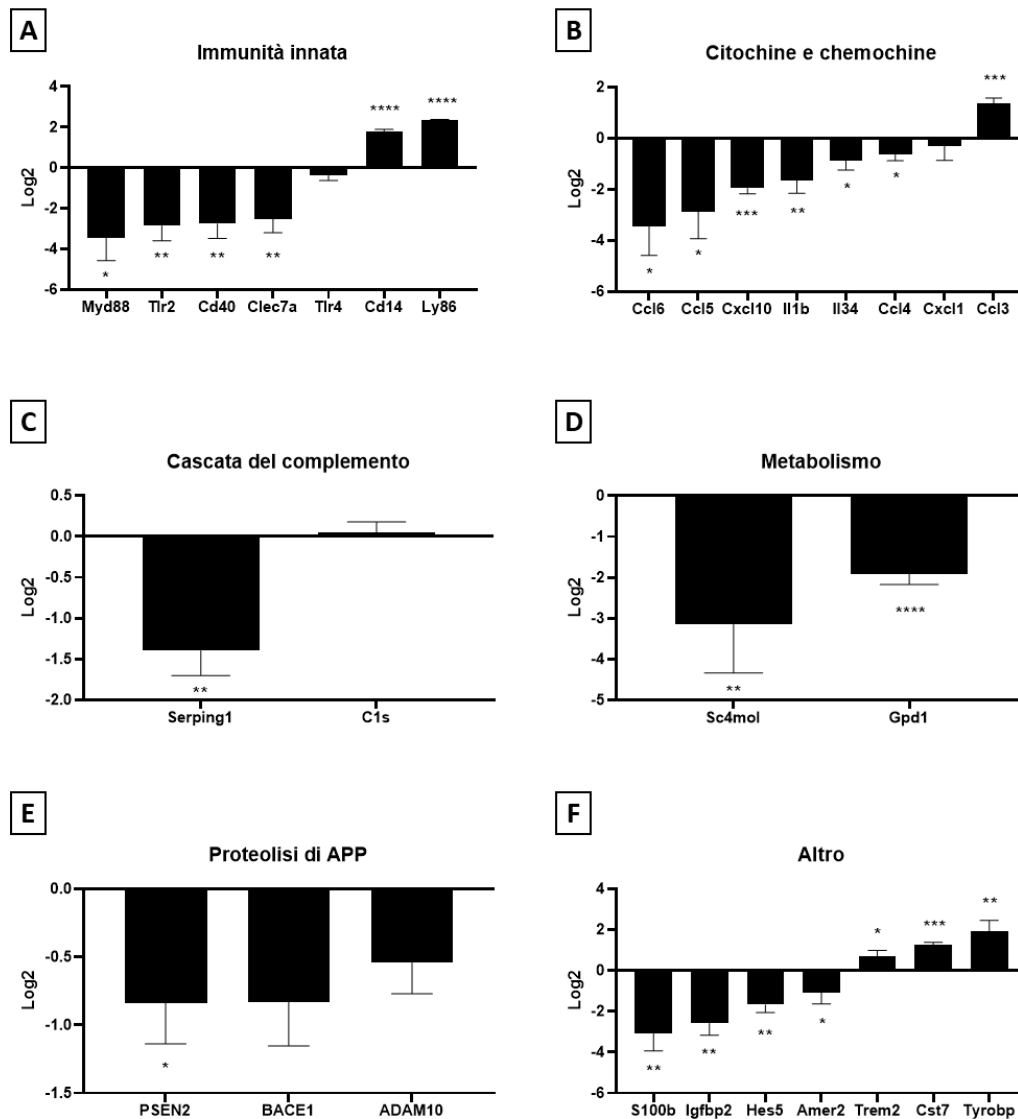


Figura 38: Valutazione dell'espressione genica tramite Real Time PCR. L'analisi è stata effettuata da cellule gliali in coltura per confrontare l'espressione genica nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR, su cui i dati sono normalizzati. I geni sono stati suddivisi in base alla categoria funzionale a cui appartengono, utilizzando il Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID): A) Immunità innata; B) Citochine e Chemochine; C) cascata del complemento; D) Metabolismo; E) Proteolisi di APP; F) Altro. Per ogni campione, sia CTR che HSV-1_{4weeks}, sono stati analizzati n=3-6 replicati biologici e l'espressione genica è riportata in Log2. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilk per verificare la normalità dei dati per ogni campione (non riportato) e in seguito il test di Student. Sono riportati i seguenti livelli di significatività: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

5.4.1 Espressione dei geni dell'immunità innata

Nella **Figura 38A** è riportata l'espressione dei geni dell'immunità innata:

- Myd88: proteina che agisce come adattatore TLR4; attiva le cellule immunitarie attraverso i Toll-like Receptors (TLR). Risulta essere down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR. La differenza è statisticamente significativa con $P < 0,05$.
- Tlr2: glicoproteina transmembrana che appartiene alla famiglia dei recettori PRRs (Pattern Recognition Receptors), in particolare la famiglia dei Toll-Like Receptor. Riconosce e lega i PAMPs (molecole prodotte dai microrganismi) e attiva così vie di trasduzione del segnale che possono stimolare processi immunitari implicati nell'inflammatione (produzione di citochine pro-infiammatorie). Risulta essere down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR con una differenza statisticamente significativa ($P < 0,01$).
- Cd40: gene che appartiene alla famiglia del recettore del Tumor Necrosis Factors (TNF). La proteina codificata è un recettore che si trova sulle cellule presentanti l'antigene, necessaria per la loro attivazione. L'espressione di questo gene appare down-regolata nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR con una differenza statisticamente significativa ($P < 0,01$)
- Clec7a: gene che codifica per un membro della famiglia C-type lectin-like domain di tipo C. Svolge un ruolo importante nelle risposte immunitarie ad agenti patogeni come batteri, virus. Produce citochine pro-infiammatorie e chemochine come TNF e Il-2. È down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al CTR e la differenza è statisticamente significativa ($P < 0,01$)
- Tlr4: proteina transmembrana che appartiene alla famiglia dei Toll-Like Receptors; la sua attivazione porta ad una via di segnalazione intracellulare NF-KB e alla produzione di citochine pro-infiammatorie, responsabile dell'attivazione del sistema immunitario innato. È down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR ma con un valore di $\text{Log}_2 = 0,05$ e $P > 0,05$ quindi la differenza di espressione di Tlr4 nei due campioni non è statisticamente significativa.
- Cd14: proteina che agisce come co-recettore insieme ai TLR4 per

mediare risposte immunitarie innate nelle infezioni da HSV-1. Nel nostro progetto, è up-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR e la differenza di espressione è statisticamente significativa poiché $P < 0,001$.

- Ly86: Lymphocyte Antigen 86. Può cooperare con CD180 e TLR4 per mediare la risposta immunitaria innata e la produzione di citochine infiammatorie. È up-regolato nel topo infetto 4 weeks rispetto al topo CTR, con una differenza statisticamente significativa ($P < 0,001$).

In conclusione, Myd88, TLR2, Cd40, Clec7a e TLR4 risultano essere down-regolati nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR, con valori di Log2 compresi tra -3,50-0,50; mentre Cd14 e Ly86 sono up-regolati nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR. La differenza di espressione è statisticamente significativa, ad eccezione del gene TLR4. Confrontando i risultati per TLR4, ottenuti in Real Time PCR e in analisi citofluorimetrica possiamo osservare che al FACS, la percentuale di cellule TLR4+ è maggiore nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR, mentre la Real Time PCR evidenzia che TLR4 è down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR. In entrambi i casi però, l'analisi statistica ci indica che la differenza di espressione di TLR4, tra topo HSV-1_{4weeks} e topo CTR, non è statisticamente significativa poiché $P > 0,05$.

Invece, per il gene CD14, il risultato ottenuto dalla Real Time PCR è confermato anche dall'analisi citofluorimetrica: infatti, CD14 risulta essere up-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR, con una differenza statisticamente significativa ($P < 0,001$); allo stesso modo, dall'analisi al FACS, la percentuale di cellule CD14+ risulta essere aumentata per il topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR.

5.4.2 Espressione di citochine e chemochine

In **Figura 38B** sono riportati i risultati della Real Time PCR per le citochine e le

chemochine:

- Ccl6: Citochina infiammatoria appartenente alla famiglia delle chemochine. Nel nostro progetto di tesi, risulta essere down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR e la differenza è statisticamente significativa ($P=0,05$).
- Ccl5: gene appartenente alla famiglia delle chemochine, coinvolto in processi immunomodulatori e infiammatori. È down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR ; la differenza di espressione di questo gene ha un valore di $P<0,05$, quindi è una differenza statisticamente significativa.
- Cxcl10: citochina appartenente alla famiglia delle chemochine che viene secreta in risposta a IFN- γ . È una citochina down-regolata nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR e la differenza è molto significativa poiché $P<0,001$.
- Il1b: gene che codifica per un membro della famiglia delle citochine dell'interleuchina 1; è un importante mediatore della risposta infiammatoria. Risulta essere down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR e la differenza di espressione è statisticamente significativa ($P<0,01$).
- Il34: citochina che promuove il rilascio di chemochine pro-infiammatorie e quindi svolge un ruolo importante nell'immunità innata e nei processi infiammatori. È down regolata nel topo infetto 4weeks rispetto al topo CTR, con un valore di $P<0,05$ quindi con una differenza di espressione significativa.
- Ccl4: nota anche come proteina infiammatoria macrofagica-1beta, è una chemochina con specificità per i recettori CCR5. Ha azione chemiotattica per le cellule natural-killer, monociti e cellule immunitarie. Nel nostro progetto di tesi, è down-regolata nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR: il valore di Log2 è molto vicino allo 0 ma la statistica conferma comunque che la differenza è significativa ($p<0,05$).
- Cxcl1: piccolo peptide appartenente alla famiglia delle chemochine. Ha

attività chemiotattica per i neutrofili e regola risposte immunitarie e infiammatorie. È down regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR ma il valore di $\text{Log}_2 = -0,38$ ci suggerisce che non vi è differenza significativa di espressione di Cxcl1 nei due campioni. Questo dato è confermato dalla statistica che riporta un valore di $P > 0,05$ e quindi una differenza statisticamente non significativa.

- Ccl3: citochina appartenente alla famiglia delle chemochine, coinvolta nella risposta infiammatoria acuta, reclutando prevalentemente neutrofili. Come si può osservare dal grafico, è l'unica chemochina a risultare up-regolata nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR. Il valore di $P < 0,001$ indica che la differenza di espressione è statisticamente significativa.

In conclusione, chemochine e citochine sono tutte down-regolate nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR, con valori di Log_2 compresi tra -0,20 e -3,50 ad eccezione di Ccl3 che risulta essere up-regolato. La differenza di espressione è per tutti i geni statisticamente significativa, tranne Cxcl1.

5.4.3 Espressione dei geni della cascata del complemento

In **Figura 38 C**, possiamo vedere la differenza di espressione dei geni della cascata del complemento tra il topo CTR e il topo HSV-14weeks.

- **Serping1**: gene che codifica per C1 inibitore, una proteina plasmatica inibitrice della serin-proteasi la cui principale funzione è l'inibizione del sistema del complemento. È coinvolto nella risposta immunitaria innata e attivazione del complemento. Nelle EGC isolate dal topo HSV-1_{4weeks} i livelli di mRNA risultano ridotti rispetto al topo CTR. Log_2 ha un valore di -1,500; inoltre la differenza di espressione di questo gene è statisticamente significativa poiché $P = 0,05$.
- **C1s**: gene che codifica per una serina-proteasi che si combina con C1q e C1r per formare C1, il primo componente della via classica del sistema del complemento. Nel nostro caso, Log_2 è in prossimità del valore 0 quindi è

leggermente up-regolato ma il valore di $P > 0,05$ ci rivela che la differenza di espressione nel topo HSV-1_{4weeks} e nel topo CTR non è significativa.

5.4.4 Espressione dei geni coinvolti nel metabolismo

In **Figura 38 D** sono riportati i geni coinvolti nel metabolismo:

- **Sc4mol:** gene che codifica per l'enzima metil-sterolo ossidasi, proteina localizzata nel reticolo endoplasmatico e coinvolta nella biosintesi del colesterolo. È down regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR ($\text{Log}_2 = -3,00$). Questo risultato è confermato dall'analisi statistica che riporta un valore di $P < 0,05$: la differenza di espressione del gene tra topo infetto e topo CTR è significativa.
- **Gdp1:** gene che codifica per un membro della famiglia della glicerolo-3-fosfato deidrogenasi NAD-dipendente. La proteina codificata è coinvolta nel metabolismo dei carboidrati e lipidi. Anche questo gene è down regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR ($\text{Log}_2 = -1,99$) e la differenza di espressione è molto significativa ($P < 0,001$).

In conclusione, entrambi i geni coinvolti nel metabolismo sono down-regolati nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR, con una differenza di espressione tra i due campioni statisticamente significativa. Questo può essere dovuto alla condizione di astrogliosi della glia enterica, durante la quale riduce le sue funzioni basali per diventare reattiva.

5.4.5 Geni coinvolti nella proteolisi di APP

In **Figura 38 E** sono rappresentati i geni coinvolti nella proteolisi di APP: sono geni che codificano per proteine appartenenti al complesso delle secretasi, enzimi responsabili della scissione della proteina precursore dell'amiloide (APP). Tutti tre i geni sono down-regolati nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR ma con un valore di $\text{Log}_2 = -0,8$ per BACE-1 e PSEN2, e un valore di $\text{Log}_2 = -0,5$ per ADAM10. Pertanto la differenza di espressione tra il topo infetto e il topo CTR

risulta essere statisticamente significativa solo per PSEN2. In conclusione, per le secretasi si verifica una down-regolazione statisticamente significativa solo per PSEN2, che è condivisa in entrambe le vie (amiloidogena e non amiloidogena), mentre per le altre secretasi il dato non è significativo, quindi sembra non esserci uno squilibrio verso una maggiore processazione di APP in amiloide nel topo HSV-1_{4weeks}.

5.4.6 Realtime geni AD – Altro

- **S100 β** : marcatore specifico per l'identificazione di cellule gliali. Nella Real Time è down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR e la differenza di espressione è significativa dal momento che l'analisi statistica rivela un valore di $P < 0,05$.
- **Igfbp2**: gene che codifica per una proteina che lega i fattori di crescita insulino-simili. Nel topo HSV-1_{4weeks} è down-regolato rispetto al topo CTR e la differenza è statisticamente significativa ($P < 0,05$)
- **Hes5**: gene che codifica per un membro di una famiglia di repressori trascrizionali di base helix-loop-helix. La proteina prodotta regola la differenziazione cellulare e svolge un ruolo importante come regolatore negativo della neurogenesi. Questo gene è down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR e questa differenza è statisticamente significativa ($P < 0,05$).
- **Amer2**: regolatore negativo della via di segnalazione del segnale coinvolto nel pattern neuroectodermico. Dall'analisi della Real Time questo gene è down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR e la differenza di espressione è significativa poiché $P < 0,05$.
- **Trem2**: gene che codifica per una proteina di membrana coinvolta nella risposta immunitaria e nella produzione di citochine infiammatorie costitutive. Questo gene è up-regolato nel topo HSV-1 4weeks rispetto al topo CTR, anche se il valore di Log2 è basso (0,7111), tuttavia l'analisi statistica riporta un valore di $P < 0,05$ e quindi la differenza di espressione è statisticamente significativa.

- **Cst7:** gene che codifica per un inibitore della proteasi della cisteina glicosilata; è coinvolto nella regolazione immunitaria. Questo gene è up-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR; questo risultato è confermato dall'analisi statistica che riporta un valore di $P < 0,01$, ad indicare che la differenza di espressione nel topo infetto e topo CTR è significativa.
- **Tyrobp:** proteina tirosin-chinasi legante la tirosina è una proteina adattatrice; appartiene alla famiglia delle glicoproteine di membrana del recettore delle Ig. È coinvolta nei processi di trasduzione del segnale e promuove risposte pro-infiammatorie nella microglia a seguito di lesioni nervose. Nel nostro modello l'espressione del gene codificante questa proteina è up-regolata nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR; inoltre, $P < 0,05$ quindi la differenza di espressione è statisticamente significativa.

In conclusione, S100 β , Igfbp2, Hes5, e Amer2 sono down-regolati nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR, con valori di espressione genica (Log2) compresi tra -1,00 e -3,50; Trem2, Cst7 e Tyrobp risultano invece essere up-regolati nel topo HSV-1_{4weeks} con valori di Log2 compresi tra 0,50 e 2,00. La differenza di espressione, sia per i geni up-regolati che down-regolati, è statisticamente significativa. Questi geni up-regolati nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR, sono geni che codificano per proteine coinvolte nella risposta immunitaria, nei processi di trasduzione del segnale e nella produzione di citochine pro-infiammatorie

5.5 Espressione di S100 β , TLR2 e TLR4 in cellule gliali enteriche isolate da topi HSV-1_{4week}

Nel nostro progetto di tesi abbiamo infine utilizzato la tecnica dell'immunofluorescenza per valutare l'immuno-reattività della proteina S100 β , TLR2 e TLR4 nelle EGC di topo CTR topo HSV-1_{4weeks} e validare così i risultati ottenuti al FACS o in Real Time PCR.

➤ S100 β

S100 β è espressa tipicamente nelle cellule gliali ed appartiene ad una famiglia di proteine a basso peso molecolare, caratterizzata da due siti di legame per il calcio con struttura elica-ansa-elica; è una proteina acida con peso molecolare di 21KDa e presenta una struttura omodimerica, cioè due polipeptidi identici legati tra loro da legami disolfuro. A livello intestinale, S100 β è specificamente e fisiologicamente espressa dalle cellule gliali enteriche.

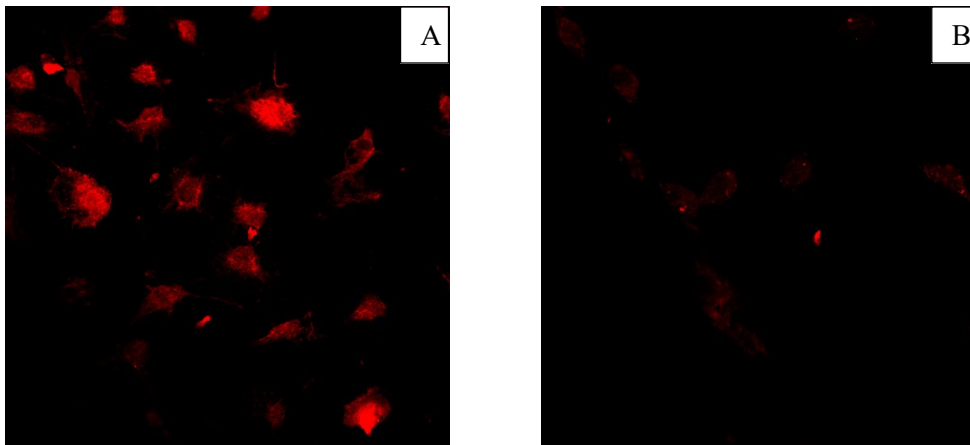


Figura 39: Immunofluorescenza per S100b in cellule gliali enteriche isolate da LMMP di topo CTR e topo HSV-14weeks. immagini ottenute al microscopio confocale che evidenziano l'espressione di S100b nel campione CTR (A) e nel campione HSV-14weeks (B). Queste immagini sono state acquisite tenendo gli stessi parametri di intensità dei laser, in modo da poter effettuare un confronto qualitativo e valutare la differenza di intensità del segnale.

Dall'analisi dal microscopio confocale a fluorescenza di cellule gliali isolate da LMMP, si può osservare in **Figura 39**, una diversa intensità del segnale a fluorescenza tra il topo CTR e il topo HSV-14weeks. Nello specifico, nel topo CTR (**Figura 39A**) il segnale di fluorescenza per S100 β ha intensità variabile mentre il segnale per S100 β nel topo HSV-14weeks (**Figura 39B**) invece è molto debole. Questi dati confermano i risultati ottenuti dalla Real Time PCR, dove S100 β era down-regolato nel topo HSV-14weeks rispetto al topo CTR. Avevamo ottenuto risultati contrastanti invece, per S100b, utilizzando la tecnica Whole Mount e l'analisi citofluorimetrica: in questi due casi infatti, la percentuale di cellule positive a S100b e l'espressione in Whole Mount di S100b era maggiore nel topo HSV-14weeks rispetto al topo CTR. Come spiegato precedentemente, la tecnica Whole Mount e l'analisi citofluorimetrica vengono effettuate sull'intero LMMP, dove oltre alle cellule gliali sono presenti anche fibre muscolari e neuroni enterici;

mentre l'immunofluorescenza e la Real Time PCR vengono effettuate sulle cellule gliali isolate. Questi risultati differenti ottenuti da LMMP e da glia isolata possono essere dovuti all'attività dei neuroni enterici: queste due tipologie cellulari vivono nello stesso microambiente e comunicano tra di loro; i neuroni possono quindi indurre dei cambiamenti sulle cellule gliali enteriche.

➤ TLR2

TLR2 è una glicoproteina transmembrana che appartiene alla famiglia dei recettori PRRs (Pattern Recognition Receptors), in particolare la famiglia dei Toll-Like Receptor; riconosce e lega i PAMPs (molecole prodotte dai microrganismi) e attiva così vie di trasduzione del segnale che possono stimolare processi implicati nell'infiammazione (produzione di citochine pro-infiammatorie).

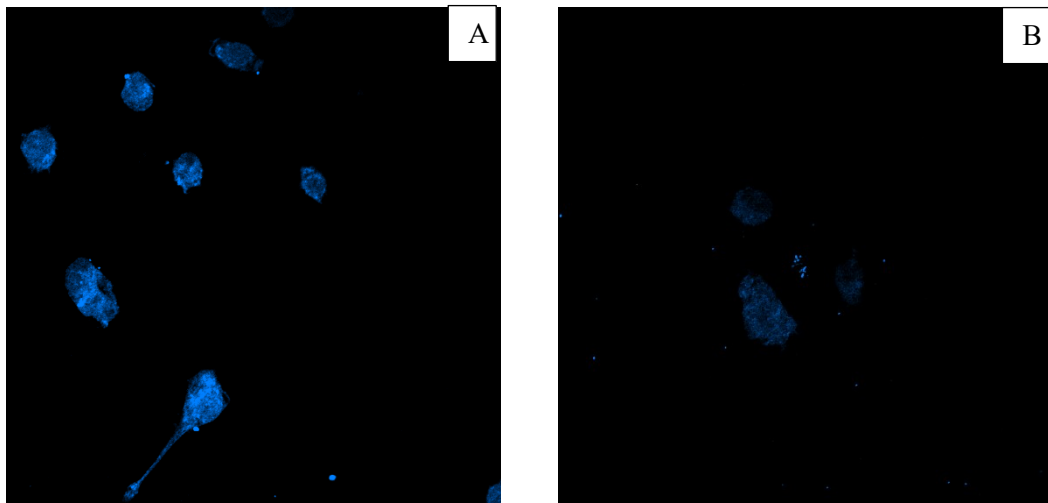


Figura 40: Immunofluorescenza per TLR2 in cellule gliali enteriche isolate da LMMP di topo CTR e topo HSV-14weeks. immagini ottenute al microscopio confocale che evidenziano l'espressione di TLR2 nel campione CTR (A) e nel campione HSV-14weeks (B). Queste immagini sono state acquisite tenendo gli stessi parametri di intensità dei laser, in modo da poter effettuare un confronto qualitativo e valutare la differenza di intensità del segnale

Dall'analisi dal microscopio confocale a fluorescenza di cellule gliali isolate da LMMP, si può osservare in **Figura 40**, una diversa intensità del segnale a fluorescenza tra il topo CTR e il topo HSV-14weeks. Nello specifico, nel topo CTR (**Figura 40A**) il segnale di fluorescenza per TLR2 ha intensità variabile tra le

diverse cellule, ma che tuttavia è maggiore dell' intensità del segnale per TLR2 osservata nelle CGE del topo HSV-1_{4weeks} (**Figura 40B**). Anche in questo caso i dati in microscopia confocale confermano i risultati ottenuti dalla Real Time PCR, dove TLR2 era down-regolato nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR. Se confrontiamo questi risultati con quelli ottenuti dall'analisi citofluorimetrica, possiamo evidenziare delle differenze: il FACS infatti ha riportato che la percentuale di cellule TLR2+ era maggiore nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR, con una differenza statisticamente significativa ($P < 0,01$). Queste differenze possono essere dovute al diverso materiale sottoposto ad analisi: il FACS analizza LMMP dell'ileo di topo, dove oltre alle cellule gliali enteriche sono presenti anche neuroni e fibre muscolari; la Real Time PCR e l'immunofluorescenza analizzano esclusivamente cellule gliali enteriche isolate.

➤ TLR4

TLR4 è una proteina transmembrana che appartiene alla famiglia dei Toll-Like Receptors; la sua attivazione porta ad una via di segnalazione intracellulare NF- κ B e alla produzione di citochine pro-infiammatorie, responsabile dell'attivazione del sistema immunitario innato.

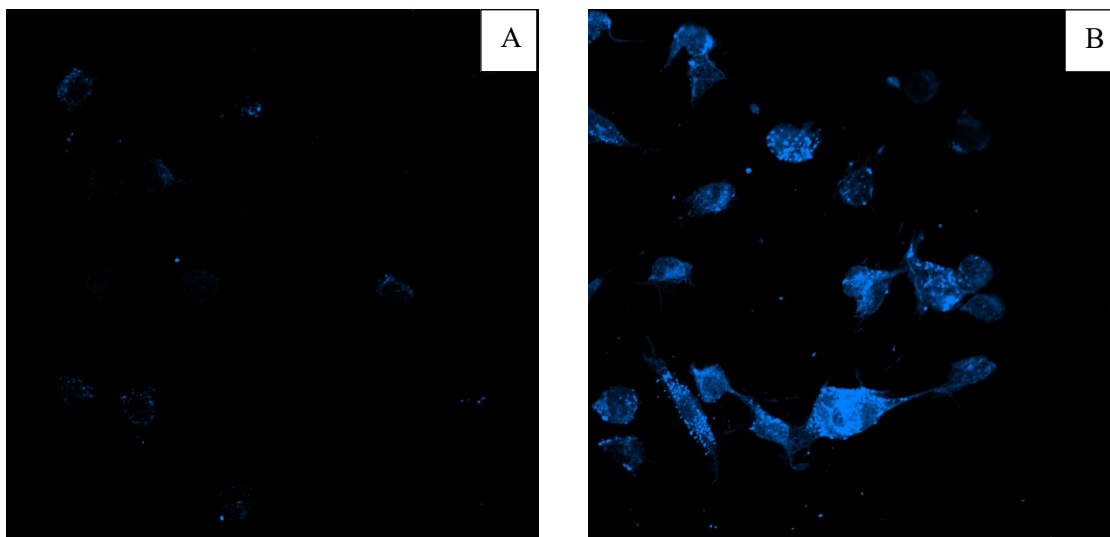


Figura 41: Immunofluorescenza per TLR4 in cellule gliali enteriche isolate da LMMP di topo CTR e topo HSV-1_{4weeks}. immagini ottenute al microscopio confocale che evidenziano l'espressione di TLR4 nel campione CTR (A) e nel campione HSV-1_{4weeks} (B). Queste immagini sono state acquisite tenendo gli stessi parametri di intensità dei laser, in modo da poter effettuare un confronto qualitativo e valutare la differenza di intensità del segnale.

Dall'analisi dal microscopio confocale a fluorescenza di cellule gliali isolate da LMMP, si può osservare in **Figura 41**, una diversa intensità del segnale a fluorescenza per TLR4 tra il topo CTR e il topo HSV-1_{4weeks}. Nello specifico, nel topo CTR (**Figura 41A**) l'intensità del segnale di fluorescenza per TLR4 è molto debole. Al contrario, nel topo HSV-1_{4weeks} (**Figura 41B**) il segnale di fluorescenza ha intensità più elevata rispetto alle cellule isolate dal topo CTR. Abbiamo quindi confermato il risultato ottenuto al FACS, dove la percentuale di cellule TLR4+ era aumentata nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR.

6. DISCUSSIONE

In questo elaborato di tesi, per comprendere il coinvolgimento di HSV-1 nelle alterazioni del Sistema Nervoso Eterico (SNE), abbiamo utilizzato un modello animale di infezione in cui inizialmente i topi sono stati infettati tramite somministrazione intranasale, evento che causa l'infezione latente nel ganglio del trigemino. Quattro settimane dopo, i topi sono stati infettati tramite inoculo orogastrico del virus. A seguito della seconda somministrazione³, il virus stabilisce un'infezione persistente nei neuroni del SNE e va incontro a riattivazioni spontanee, sebbene abortive causando la comparsa di classici marcatori di neurodegenerazione quali aumentata espressione della APP, accumulo di beta amiloide, perdita di acetilcolina e marcatori delle vescicole sinaptiche. Poiché nelle patologie neurodegenerative come AD è stato riportato un coinvolgimento della glia, in questo progetto di tesi abbiamo verificato se il fenotipo delle cellule gliali enteriche (CGE) sia compatibile con quanto osservato nella glia del SNC in modelli animali di AD o in soggetti con AD. Mrack et al. (2005)¹⁴⁶ infatti, avevano osservato che l'attivazione delle cellule gliali e la sovra-espressione di citochine possono contribuire alla neurodegenerazione tipica della malattia di Alzheimer. Come per gli astrociti del SNC, nelle cellule gliali enteriche, in seguito a infiammazione o lesioni, si instaura una condizione di gliosi reattiva, in cui le CGE aumentano l'espressione di GFAP e di alcuni marcatori della risposta immunitaria. Frost et al. (2017)¹⁴⁷ hanno infatti rilevato che l'astrogliosi reattiva, osservata nei tessuti post-mortem di pazienti con AD e in modelli murini, è una caratteristica universalmente riconosciuta dell'AD ed è caratterizzata da ipertrofia cellulare, aumento della proteina acida fibrillare gliale (GFAP) e dell'espressione di S100 β . Per verificare se nei topi sottoposti ad infezione da HSV-1 si instaura un'attivazione della glia enterica, abbiamo effettuato un'analisi citofluorimetrica sulle cellule gliali enteriche contenute nel LMMP di ileo di topo a diversi time point di infezione: all'aumentare della tempistica di infezione, abbiamo riscontrato un aumento dell'attivazione della glia caratterizzato dalla espressione di citochine pro-infiammatorie (IFN γ) ed espressione di marcatori della risposta immunitaria di tipo innato. L'attivazione della glia appare più marcata a 8 e 10 settimane di

infezione, anche se le prime evidenze sono rilevabili a 4 settimane post-infezione orogastrica. In particolare, nei topi sottoposti ad infezione da HSV-1, rispetto al topo CTR, si verifica un aumento della percentuale di cellule GFAP+/IFN γ +, GFAP+/CD14+, GFAP+/S100 β +, GFAP+/TLR2+, GFAP+/TLR4+, ad indicare che, nei topi sottoposti ad infezione, nel LMMP si instaura una condizione di gliosi reattiva. Questi risultati ottenuti concordano con quanto riportato da Neunlist et al. (2014)¹⁴⁸ i quali avevano osservato che l'attivazione delle cellule gliali, porti ad un aumento dell'espressione di GFAP, di S100 β , di citochine pro-infiammatorie come IFN γ e all'attivazione di TLR2/TLR4, proteine transmembrana che appartengono alla famiglia dei *Toll-Like Receptors*. Il loro coinvolgimento porta all'attivazione della via di segnalazione intracellulare di NF-KB, alla produzione di citochine pro-infiammatorie ed al conseguente innesco di una risposta immunitaria di tipo innato. Successivamente ci siamo focalizzati sulla proteina S100 β , marcatore specifico per l'identificazione di cellule gliali, e abbiamo rilevato, utilizzando la tecnica di IF su preparati Whole Mount della parete intestinale, un aumento dell'immunoreattività per questa proteina nelle cellule della glia enterica in topi infettati da HSV-1. L'immunoreattività aumenta all'aumentare della durata dell'infezione, con una maggiore intensità di segnale nel topo HSV-1_{8weeks}. Questi risultati confermano i dati ottenuti dall'analisi quantitativa al FACS, dove la percentuale di cellule gliali positive a S100 β , è risultata aumentata a partire dalle 4 settimane di infezione ed ha raggiunto il massimo ad 8 settimane. Ulteriori conferme provengono dalla letteratura scientifica, in cui Frost et al. hanno rilevato che in una condizione di gliosi reattiva, si ha un aumento dell'espressione di S100 β .¹⁴⁸ Analizzando l'espressione di S100 β , sia a livello di mRNA che di proteina, in colture di cellule gliali enteriche ottenute da topi infetti da 4 settimane abbiamo riscontrato una discordanza con i dati ottenuti dall'analisi in vivo. Infatti i livelli di mRNA codificante per S100 β e la immunoreattività per S100 β sono ridotte cellule gliali enteriche ottenute da topi infetti rispetto alle cellule ottenute da topo sano. E' ipotizzabile che i risultati differenti ottenuti analizzando direttamente l'LMMP e le cellule della glia enterica isolata possono essere dovuti all'assenza dei "segnali" provenienti dai neuroni enterici infetti. Infatti precedenti lavori suggeriscono che "segnali" di origine neuronale e gliale sono essenziali nel modificare il fenotipo e

l'attività funzionale della unità funzionale glia-neuroni (Front Cell Neurosci. 2020; 14: 20). Una down-regolazione di S100 β è stata confermata da Orre et al. (2014),¹⁴⁹ i quali hanno utilizzato un modello murino di AD doppio transgenico APPswePS1dE9 per rilevare cambiamenti molecolari negli astrociti e nelle microglia attivata e per effettuare un'analisi tramite Real Time PCR a livello di trascrittoma delle popolazioni di astrociti e microglia AD e Wild Type (WT). Da questa analisi è infatti emerso che S100 β è down regolato nel topo AD rispetto al Wild Type.

Procedendo con il nostro progetto di tesi, abbiamo analizzato l'espressione di due recettori della immunità innata, in particolare il TLR2 ed il TLR4, proteine transmembrana che appartengono alla famiglia dei Toll-Like Receptors. Utilizzando la tecnica dell'immunofluorescenza, abbiamo rilevato una espressione differenziale dei due recettori. Infatti, mentre abbiamo riscontrato un aumento dell'espressione del TLR4 nelle cellule gliali enteriche isolate dal topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR, nel caso del TLR2 abbiamo riscontrato una ridotta espressione del recettore nelle cellule gliali enteriche ottenute da topi infetti per via orogastrica da 4 settimane. L'espressione di vari recettori della immunità innata conferma la capacità di queste cellule di rilevare e rispondere a diversi stimoli ambientali, ed una volta attivati innescano via di segnalazione intracellulari come l'NF-KB che contribuiscono a generare delle risposte "stereotipate" difensive che includono la produzione di citochine e chemochine e sostanze antimicrobiche come l'ossido nitrico. Ad esempio, Sarnelli et al.¹⁵⁰ hanno analizzato colture primarie di CGE umane esposte a microrganismi patogeni ed hanno rilevato l'attivazione dei Toll-like Receptors, con conseguente aumento dello stato infiammatorio e una maggiore espressione di S100 β . Questi risultati confermano il coinvolgimento dei TLR nei processi neurodegenerativi e cambiamenti nella espressione è stata riportata sia nella astroglia che nella microglia a livello del SNC¹⁵⁴ Peraltro, come osservato da Weigang Cui et al.,¹⁵³ la glia può svolgere un ruolo essenziale nell'amplificare il danno ai neuroni nel corso delle malattie neurodegenerative riconoscendo attraverso i recettori della immunità innata (i.e. TLR) tipiche strutture molecolari associate a queste patologie (i.e beta-amiloide, aggregati di sinucleina).

Al fine di verificare ulteriormente se nelle CGE isolate dal topo HSV-1_{4weeks} si

sviluppi un fenotipo *Alzheimer Disease-like* abbiamo valutato l'espressione nei topi infettati da HSV-1_{4weeks} di un pannello di geni selezionati dalla letteratura ¹⁴⁹. In particolare abbiamo rilevato nelle cellule gliali enteriche isolate da topo infetto una significativa down-regolazione dei geni coinvolti nel metabolismo (biosintesi del colesterolo, metabolismo dei carboidrati e dei lipidi) tra cui Sc4mol e Gdp1. Questa down-regolazione è stata posta in relazione alla condizione di attivazione (i.e. astrogliosi), durante la quale riduce le sue funzioni basali per diventare reattiva¹⁴⁹. Megan et al. hanno infatti rilevato che gli astrociti trasformandosi da uno stato basale a uno reattivo, trascurano le loro funzioni neurosupportive, rendendo così i neuroni vulnerabili all'eccitotossicità e allo stress ossidativo. Steele et al. hanno osservato che in una condizione di astrogliosi, si verifica una riduzione dei livelli di ATP intracellulari, un aumento di 3 volte dell'utilizzo del glucosio, una marcata diminuzione delle riserve intracellulari di glicogeno e un aumento dell'efflusso di perossido di idrogeno, che contribuisce allo stress ossidativo. Questo fenotipo astrocitico alterato può aumentare attivamente la vulnerabilità neuronale, sia attraverso un metabolismo energetico interrotto che attraverso un aumento del rilascio di perossido di idrogeno.¹⁵²

Numerosi geni della risposta immunitaria l'espressione di Cd14 e Ly86 (geni appartenenti alla risposta immunitaria), Ccl3 (chemochina coinvolta nella risposta infiammatoria acuta), Trem2, Cst7 e Tyrobp (geni che codificano per proteine coinvolte nella risposta immunitaria, nei processi di trasduzione del segnale e nella produzione di citochine pro-infiammatorie) risultano essere up-regolati nel topo HSV-1_{4weeks}. Questi risultati confermano quanto riportato da Orre et al.¹⁴⁹ i quali, utilizzando un modello murino AD doppio transgenico APP^{swe}PS1^{dE9}, hanno rilevato negli astrociti un aumento dell'espressione dei geni dell'immunità, come Cd14 e Ly86, e in parallelo una riduzione di geni normalmente molto espressi in astrociti per il controllo delle funzioni fisiologiche (es. biosintesi colesterolo, regolazione di sviluppo e differenziamento neuronale, trasmissione sinaptica); infatti, hanno riportato una down-regolazione di Sc4mol e Gdp1, evento che si traduce in una riduzione delle funzioni fisiologiche e un cambiamento verso uno stato reattivo. Quindi, la presenza di HSV-1 nei gangli enterici stimola il sistema immunitario, il quale nel tentativo di eliminare l'infezione instaura un processo

infiammatorio probabilmente analogo a quello che si manifesta nel cervello durante le riattivazioni virali.

Analizzando, infine, l'espressione degli enzimi coinvolti nella proteolisi di APP (ADAM-10, PSEN2 e BACE-1) abbiamo rilevato che sono down-regolati nel topo HSV-1_{4weeks} rispetto al topo CTR ma con una differenza statisticamente significativa solo per PSEN2, mentre per le altre secretasi (BACE-1 e ADAM10) il dato non è significativo, quindi sembra non esserci uno squilibrio verso una maggiore processazione di APP nella forma amiloidogena nel topo HSV-1_{4weeks} ad opera delle proteasi generate dalla glia enterica. Questi risultati non sono coerenti a quanto riportato in letteratura, poiché Hartlage-Rubsamen *et al.* ¹⁵¹ hanno dimostrato che l'attivazione delle cellule gliali induce l'espressione di BACE1 in sei modelli di ratto e hanno trovato marcati aumenti dell'espressione di BACE1 negli astrociti GFAP-positivi nei modelli cronici di stress. Potrebbe essere utile quindi, confermare e validare i dati ottenuti a livello di mRNA con una analisi dei livelli di proteine ad esempio mediante Western Blot. In letteratura, sull'attività della γ -secretasi (PSEN-2), ci sono ancora poche informazioni; Frost *et al.* hanno rilevato che l'attività di questo enzima non è correlata alla quantità di subunità catalitica e questo rende difficile la quantificazione. Non sorprende quindi che si sappia poco sull'attività della γ -secretasi negli astrociti nell'AD.

7. CONCLUSIONI

In questo progetto di tesi, abbiamo analizzato le cellule gliali enteriche sottoposte ad infezione persistente da HSV-1 per verificare se sviluppano un fenotipo *Alzheimer Disease-like* e siamo arrivati alla conclusione che, l'analisi del fenotipo delle cellule gliali enteriche nei topi infetti per via orogastrica con HSV-1 ha evidenziato numerose caratteristiche in linea con quanto riportato in letteratura per la glia del SNC in corso di malattia di Alzheimer confermando la rilevanza del modello sperimentale utilizzato nel nostro studio. Pertanto questo modello sperimentale rappresenta un'ottima piattaforma per studiare sia il comportamento della glia nel corso delle malattie neurodegenerative e comprenderne i meccanismi molecolari. Sfruttando queste conoscenze, sarà poi possibile sviluppare interventi terapeutici mirati per poter influenzare lo sviluppo del danno neuronale.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors
M K Kukhanova , A N Korovina, S N Kochetkov (2014)
2. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features* Paolo G. Arduino¹ , Stephen R. Porter (2007)
3. Persistent Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Enteric Neurons Triggers CD8 T Cell Response and Gastrointestinal Neuromuscular Dysfunction Paola Brun, Jessica Conti, Veronica Zatta, Venera Russo, Melania Scarpa, Andromachi Kotsafti, Andrea Porzionato, Raffaele De Caro, Marco Scarpa, Matteo Fassan, Arianna Calistri and Ignazio Castagliuolo (2021)
4. The Cycle of Human Herpes Simplex Virus Infection: Virus Transport and Immune Control Anthony L. Cunningham, Russell J. Diefenbach, Monica Miranda-Saksena, Lidija Bosnjak, Min Kim, Cheryl Jones, and Mark W. Douglas¹ (2006)
5. Estimating seroprevalence of herpes simplex virus type 1 among different Middle East and North African male populations residing in Qatar Gheyath K. Nasrallah PhD, Soha R. Dargham MPH, Layla I. Mohammed BSc (2017)
6. Looker, K. J., Magaret, A. S., May, M. T., Turner, K. M., Vickerman, P., Gottlieb, S. L., et al. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. (2015)
7. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors
M K Kukhanova¹, A N Korovina, S N Kochetkov (2014)

8. Herpes simplex keratitis, Science direct H.E.KaufmanMDY.M.Centifanto-FitzgeraldPhDE.D.VarnellBS
9. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors
M K Kukhanova¹, A N Korovina, S N Kochetkov (2014)
10. Molecular Mechanisms for Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis in Alzheimer's Disease Steven A. Harris and Elizabeth A. Harris (2018)
11. The HSV-1 Latency-Associated Transcript Functions to Repress Latent Phase Lytic Gene Expression and Suppress Virus Reactivation from Latently Infected Neurons Michael P. Nicoll, William Hann, Maitreyi Shivkumar, Laura E. R. Harman, Viv Connor, Heather M. Coleman, João T. Proença, Stacey Efstathiou (2016)
12. Association of the cellular coactivator HCF-1 with the Golgi apparatus in sensory neurons. Kolb G, Kristie TM (2008)
13. Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA
HIROYUKI HIRAI, TETSUYA TANI, and NOBUAKI KIKYO (2012)
14. HSV, axonal transport and Alzheimer's disease: in vitro and in vivo evidence for causal relationships Elaine L Bearer (2012)
15. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection
Graciela Kunrath Lima, Guilherme Pimenta Zolini, Daniel Santos Mansur, Bráulio Henrique Freire Lima, Uschi Wischhoff, Ruiz Gerhardt Astigarraga, Marcela França Dias, Mariana das Graças Almeida Silva, Samantha Ribeiro Béla, Lis Ribeiro do Valle Antonelli, Rosa Maria Arantes, Ricardo Tostes Gazzinelli, André Báfica, Erna Geessien Kroon, Marco Antônio Campos (2010)

16. . Latent Herpesvirus Infection in Human Trigeminal Ganglia Causes Chronic Immune Response Diethilde Theil, Tobias Derfuss, Igor Paripovic, Simone Herberger, Edgar Meinl, Olaf Schueler, Michael Strupp, Viktor Arbusow, and Thomas Brandt (2003)

17. Immune control of herpes simplex virus during latency
Kamal MKhanna Andrew JLepisto VilmaDecman Robert LHendricks (2004)

18. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-
reactivation cycle Guey-Chuen Perng , Clinton Jones (2010)

19. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors
M K Kukhanova¹, A N Korovina, S N Kochetkov (2014)

20. Molecular Mechanisms for Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis in
Alzheimer's Disease Steven A. Harris and Elizabeth A. Harris (2018)

21. Alzheimer and his disease: a brief history Gabriele Cipriani, Cristina
Dolciotti, Lucia Picchi Ubaldo Bonuccelli (2011)

22. Alzheimer Disease
Anil Kumar , Jaskirat Sidhu , Amandeep Goyal , Jack W. Tsao (2021)

23. Molecular Mechanisms for Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis in
Alzheimer's Disease Steven A. Harris and Elizabeth A. Harris (2018)

24. Sex differences in Alzheimer disease - the gateway to precision medicine
Maria Teresa Ferretti , Maria Florencia Iulita , Enrica Cavedo , Patrizia Andrea
Chiesa , Annemarie Schumacher Dimech , Antonella Santucci
Chadha , Francesca Baracchi , H el ene Girouard , Sabina Misoch , Ezio

Giacobini , Herman Depypere , Harald Hampe (2018)

25. Time, sex, gender, history, and dementia Walter A. Rocca (2017)

26. Dementia statistics How many people have dementia worldwide? Are the number increasing? (2020)

27. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology Morgan Robinson , Brenda Y Lee , Francis T Hane (2017)

28. Number of people with dementia worldwide (2015)

29. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study

Cleusa P Ferri , Martin Prince, Carol Brayne, Henry Brodaty, Laura Fratiglioni, Mary Ganguli, Kathleen Hall, Kazuo Hasegawa, Hugh Hendrie, Yueqin Huang, Anthony Jorm, Colin Mathers, Paulo R Menezes, Elizabeth Rimmer, Marcia Scazufca, Alzheimer's Disease International (2005)

30. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management Arileza et al. (2019)

31. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment L W Chu (2012)

32. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment Leide Caroline dos Santos Picança,* , Priscilla Farias Ozelaa , Maiara de Fátima de Brito Britoa , Abraão Alves Pinheiroa , Elias Carvalho Padilhab , Francinaldo Sarges Bragac , Carlos Henrique Tomich de Paula da Silvad , Cleydson Breno Rodrigues dos Santosc , Joaquín María Campos Rosad,e and Lorane Izabel da Silva Hage-Melima. (2016)

33. The hippocampal longitudinal axis-relevance for underlying tau and TDP-43 pathology Albert Lladó , Adrià Tort-Merino , Raquel Sánchez-Valle , Neus

- Falgàs , Mircea Balasa , Beatriz Bosch , Magda Castellví , Jaume Olives , Anna Antonell , Michael Hornberger (2018)
34. Alzheimer's Disease: a Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New perspectives for Pharmacological Treatment. LLeide caroline dos Santos Picanco (2016)
35. Alzheimer Disease Anil Kumar , Jaskirat Sidhu , Amandeep Goyal , Jack W. Tsao (2021)
36. Neuroscience Amyloid hypothesis or vascular hypotesis in Alzheimer Disease
37. APP processing in Alzheimer's disease Yun-wu Zhang , Robert Thompson, Han Zhang, Huaxi Xu (2011)
38. HSV-1 and Alzheimer's disease: more than a hypothesis Roberto Piacentini, Giovanna De Chiara, Domenica D. Li Puma, Cristian Ripoli, Maria E. Marcocci, Enrico Garaci, Anna T. Palamara and Claudio Grassi (2014)
39. APP processing in Alzheimer's disease Yun-wu Zhang¹, Robert Thompson, Han Zhang, Huaxi Xu (2011)
40. Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. Di Carlo M (2010)
41. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity Cardenàas (2014)
42. HSV-1 and Alzheimer's disease: more than a hypothesis Roberto Piacentini, Giovanna De Chiara, Domenica D. Li Puma, Cristian Ripoli, Maria E. Marcocci, Enrico Garaci, Anna T. Palamara and Claudio Grassi (2014)
43. Phosphorylation of Amyloid Precursor Protein (APP) at Thr668 Regulates the

Nuclear Translocation of the APP Intracellular Domain and Induces Neurodegeneration Authors: Keun-A Chang, Hye-Sun Kim, Tae-Young Ha, Ji-Won Ha, Ki Young Shin, Yun Ha Jeong, Jean-Pyo Lee, Cheol Hyoung Park, Seonghan Kim, Tae-Kyoung Baik (2006)

44. The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease Holly M. Brothers, Maya L. Gosztyla and Stephen R. Robinson (2018)

45. What is the Physiological Function of Amyloid beta protein? John E. Morley (2019)

46. β -Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease Gunnar K Gouras¹, Tomas T Olsson, Oskar Hansson (2015)

47. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both? Vanessa de Jesus R de Paula , Fabiana Meira Guimarães , Breno Satler Diniz , Orestes Vicente Forlenza (2009)

48. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development Guo-fang Chen, Ting-hai Xu, Yan Yan, Yu-ren Zhou, Yi Jiang, Karsten Melcher & H Eric Xu (2017)

49. The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders Rodrigo Medeiros¹, David Baglietto-Vargas, Frank M LaFerla (2011)

50. Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease Michala Kolarova, Francisco García-Sierra, Ales Bartos, Jan Ricny, and Daniela Ripova (2012)

51. Phosphorylation of Tau Protein as the Link between Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Connectivity Failure: Implications for Alzheimer's Disease Siddhartha Mondragón-Rodríguez, George Perry, Xiongwei Zhu, Paula I. Moreira, Mariana C. Acevedo-Aquino, and Sylvain Williams (2013)
52. Molecular Mechanisms for Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis in Alzheimer's Disease Steven A. Harris and Elizabeth A. Harris (2018)
53. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies
K Iqbal¹, F Liu, C-X Gong, I Grundke-Iqbal (2010)
54. Role of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player (2020)
55. Shedding light on tau protein aggregation: the progress in developing highly selective fluorophores Peter Verwilt, Hyeong Seok Kim, Soobin Kim, Chulhun Kang and Jong Seung Kim (2018)
56. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures
Marcos Vinícius Ferreira Silva , Cristina de Mello Gomide Loures , Luan Carlos Vieira Alves , Leonardo Cruz de Souza , Karina Braga Gomes Borges , Maria das Graças Carvalho (2019)
57. Review paper Risk factors for Alzheimer's disease Richard A. Armstrong 1. Vision Sciences, Aston University, Birmingham, United Kingdom (2019)
58. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures
Marcos Vinícius Ferreira Silva , Cristina de Mello Gomide Loures , Luan Carlos Vieira Alves , Leonardo Cruz de Souza , Karina Braga Gomes Borges , Maria das Graças Carvalho (2019)

59. Infectious hypothesis of Alzheimer disease Charles E. Seaks,
Donna M. Wilcock (2020)
60. Persistent Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Enteric Neurons Triggers
CD8⁺ T Cell Response and Gastrointestinal Neuromuscular Dysfunction
(2021)
61. Molecular Mechanisms for Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis in
Alzheimer's Disease Steven A. Harris and Elizabeth A. Harris (2018)
62. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New
Perspectives for Pharmacological Treatment
Leide Caroline Dos Santos Picanco , Priscilla F Ozela , Maiara de Fatima de Brito
Brito , Abraao A Pinheiro , Elias C Padilha , Francinaldo S Braga , Carlos
Henrique Tomich de Paula da Silva , Cleydson Breno Rodrigues Dos
Santos , Joaquín M C Rosa , Lorane Izabel da Silva Hage-Melim
63. Clinical Development of Aducanumab, an Anti-A β Human Monoclonal
Antibody Being Investigated for the Treatment of Early Alzheimer's Disease
S Budd Haeberlein¹, J O'Gorman, P Chiao, T Bussière, P von Rosenstiel, Y
Tian, Y Zhu, C von Hehn, S Gheuens, L Skordos, T Chen, A Sandrock (2017)
64. Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease Woan-Ru Lin, Matthew A.
Wozniak, Robert J. Cooper, Gordon K. Wilcock, Ruth F. Itzhaki (2002)
65. Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors
in Sporadic Alzheimer's Disease Steven A. Harris and Elizabeth A. Harris (2015)

66. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques M A Wozniak , A P Mee, R F Itzhaki (2009)
67. Infectious hypothesis of Alzheimer disease Charles E. Seaks, Donna M. Wilcock (2020)
68. Corroboration of a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's Disease Ruth F Itzhaki (2018)
69. Seropositivity to Herpes Simplex Virus Antibodies and Risk of Alzheimer's Disease: A Population-Based Cohort Study Luc Letenneur ,Karine Pérès, Hervé Fleury,Isabelle Garrigue, Pascale Barberger-Gateau, Catherine Helmer,Jean-Marc Orgogozo, Serge Gauthier, Jean-François Dartigues (2008)
70. Anti-herpetic Medications and Reduced Risk of Dementia in Patients with Herpes Simplex Virus Infections—a Nationwide, Population-Based Cohort Study in Taiwan Nian-Sheng Tzeng (2018)
71. Persistent Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Enteric Neurons Triggers CD8⁺ T Cell Response and Gastrointestinal Neuromuscular Dysfunction Brun (2021)
72. Recurrent herpes simplex virus-1 infection induces hallmarks of neurodegeneration and cognitive deficits in mice, Giovanni De Chiara (2019)
73. Molecular Mechanisms for Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis in Alzheimer's Disease Steven A. Harris and Elizabeth A. Harris (2018)
74. Controversial role of herpesviruses in Alzheimer's disease Roberta Rizzo

Katherine R. Spindler, Editor (2020)

75. The viral protein corona directs viral pathogenesis and amyloid aggregation

Kariem Ezzat (2019)

76. Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide D H Cribbs , B Y Azizeh, C W Cotman, F M LaFerla (2000)

77. HSV-1 promotes Ca²⁺ -mediated APP phosphorylation and A β accumulation in rat cortical neurons

Roberto Piacentini , Livia Civitelli, Cristian Ripoli, Maria Elena Marcocci, Giovanna De Chiara, Enrico Garaci, Gian Battista Azzena, Anna Teresa Palamara, Claudio Grassi (2011)

78. Different Aggregation Pathways and Structures for A β 40 and A β 42 Peptides

Li Wang, Kilho Eom, and Taeyun Kwon (2021)

79. APP Processing Induced by Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Yields Several APP Fragments in Human and Rat Neuronal Cells

Giovanna De Chiara, Maria Elena Marcocci, Livia Civitelli, Rafaela Argnani, Roberto Piacentini, Cristian Ripoli, Roberto Manservigi, Claudio Grassi, Enrico Garaci,⁵ and Anna Teresa Palamara (2010)

80. Alzheimer's disease-specific tau phosphorylation is induced by herpes simplex virus type 1 Matthew A Wozniak , Alison L Frost, Ruth F Itzhaki (2009)

81. Tau cleavage at D421 by caspase-3 is induced in neurons and astrocytes infected with herpes simplex virus type 1 Rodrigo Lerchundi , Rodrigo

Neira, Sharin Valdivia, Karin Vio, Margarita I Concha, Angara Zambrano, Carola Otth (2011)

82. Autophagy: cellular and molecular mechanisms

Danielle Glick, Sandra Barth, and Kay F. Macleod (2010)

83. Articles, Neurobiology of Disease Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to Autophagic Pathology in Alzheimer's Disease Barry Boland, Asok Kumar, Sooyeon Lee, Frances M. Platt, Jerzy Wegiel, W. Haung Yu and Ralph A. (2008)

84. Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to Autophagic Pathology in Alzheimer's Disease B.Boland (2008)

85. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease Ralph A. Nixon (2007)

86. Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's Disease: The Enemy Within Ruth F. Itzhaki* and Matthew A. Wozniak (2008)

87. Corroboration of a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's Disease Ruth F. Itzhaki (2018)

89. Lin WR, Graham J, MacGowan SM, Wilcock GK, Itzhaki RF. Alzheimer's disease, herpes virus in brain, apolipoprotein E4 and herpes labialis (1997)

90. Effect of Apolipoprotein E on the Cerebral Load of Latent Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Carlos Ramirez, Isabel Sastre, Fernando Valdivieso (2006)

91. Robust expression of TNF- α , IL-1 β , RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus James R. Lokensgard, Shuxian Hu, Wen Sheng, Marieke vanOijen, Diana Cox, Maxim C. - J. Cheeran & Phillip K. Peterson (2001)
92. Cytokine production in the nervous system of mice during acute and latent infection with herpes simplex virus type 1 Carolyn Shimeld, Joanne L. Whiteland, Neil A. Williams, David L. Easty, Terry J. Hill (1997)
93. Inflammatory and Neurodegeneration Markers during Asymptomatic HSV-1 Reactivation (2014)
94. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration Christopher K. Glass, Kaoru Saijo, Beate Winner, Maria Carolina Marchetto, and Fred H. Gage (2010)
95. Inflammation and Alzheimer's disease (2000)
96. Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system T Valyi-Nagy , T S Dermody (2005)
97. Defining ROS in Biology and Medicine Robert Li, Zhenquan Jia, and Michael A. Trush (2016)
98. Oxidative Stress Enhances Neurodegeneration Markers Induced by Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Human Neuroblastoma Cells Soraya Santana, Isabel Sastre, Maria Recuero, Maria J. Bullido, and Jesus Aldudo (2013)
99. Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by products in mouse P19N neural cell cultures

Jerry Kavouras (2007)

100. Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease

Zhiyou Cai , Bin Zhao, Anna Ratka (2011)

101. The enteric nervous system and neurogastroenterology John B

Furness (2012)

102. Enteric nervous system manifestations of neurodegenerative disease

Alcmène Chalazonitis, Ph.D.and Meenakshi Rao, M.D., Ph.D. (2018)

103. Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut Aaron K. Chow and Brian D. Gulbransen (2017)

104. Enteric glia A Rühl , Y Nasser, K A Sharkey (2006)

105. Enteric Glial-Derived S100B Protein Stimulates Nitric Oxide Production in Celiac Disease Giuseppe Esposito (2007)

106. Astrocytes: biology and pathology Michael V Sofroniew , Harry V Vinters (2010)

107. Signaling pathways regulating neuron-glia interaction and their implications in Alzheimer's disease Hong Lian e Hui Zheng (2016)

108. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases Lucile Ben Haim, Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage, Kelly Ceyzériat and Carole Escartin (2015)

109. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease
Georgia R. Frost and Yue-Ming Li (2017)
110. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease Markel Olabarria, Harun N. Noristani, Alexei Verkhatsky, José J. Rodríguez (2010)
111. Rodríguez JJ, Yeh C-Y, Terzieva S, Olabarria M, Kulijewicz-Nawrot M, Verkhatsky. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. (2014)
112. The effects of amyloid on astrocyte proliferation and activation in vitro Hou L, Liu Y, Wang X, Ma H, He J, Zhang Y, Yu C, Guan W, Ma Y. (2011)
113. The contribution of activated astrocytes to A β production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis Jie Zhao, Tracy O'Connor & Robert Vassar (2011)
114. β -Secretase activity in rat astrocytes: translational block of BACE1 and modulation of BACE2 expression Barbara Bettegazzi, Marija Mihailovich, Alessandra Di Cesare, Alessandra Consonni, Romina Macco, Ilaria Pelizzoni, Franca Codazzi, Fabio Grohovaz, Daniele Zacchetti (2011)
115. Interferon γ stimulates β -secretase expression and sAPP β production in astrocytes Hong Hs (2003)
116. Buggia-Prevot V, Sevalle J, Rossner S, Checler F. 2008. NF κ B-dependent control of BACE1 promoter transactivation by A β 42. (2008)
117. Bourne KZ, Ferrari DC, Lange-Dohna C, Roßner S, Wood TG, Perez-Polo JR.. Differential regulation of BACE1 promoter activity by nuclear factor- κ B in

neurons and glia when exposed to β -amyloid peptides. *J. Neurosci. Res* (2007)

118. . Colloquium Series on Neuroglia in Biology and Medicine: From Physiology to Disease Editors Alexei Verkhratsky, M.D., Ph.D., D.Sc., M.A.E., M.L., M.R.A.N.F.

119. Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases Fernando Ochoa-Cortes, PhD, Fabio Turco, PhD, Andromeda Linan-Rico, PhD, Suren Soghomonyan, MD, PhD, Emmett Whitaker, MD, Sven Wehner, PhD, Rosario Cuomo, MD, and Fievos L. Christofi, (2016)

120. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes L F Eng (1985)

121. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000) Lawrence F. Eng, Roopa S. Ghirnikar & Yuen L. Lee (2000)

122. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system Milos Pekny (2015)

123. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture Vincenzo Bramanti, Daniele Tomassoni, Marcello Avitabile, Francesco Amenta, Roberto Avola (2010)

124. S100B protein in the gut: The evidence for enteroglial-sustained intestinal inflammation Carla Cirillo, Giovanni Sarnelli, Giuseppe Esposito, Fabio Turco, Luca Steardo, and Rosario Cuomo (2011)

125. Enteric Glial-Derived S100B Protein Stimulates Nitric Oxide Production in Celiac Disease Giuseppe Esposito (2007)

127. S100 β expression in Alzheimer's disease: Relation to neuropathology in brain regions Linda J. Van Eldik, W. Sue T. Griffin (1994)

128. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat A. Rühl, J. Trotter, W. Stremmel (2001)

129. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease Julie Cabarrocas, Tor C. Savidge, Roland S. Liblau (2003)

130. A novel enteric neuron–glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development Catherine Le Berre-Scoul, Julien Chevalier, Elena Oleynikova, François Cossais, Sophie Talon, Michel Neunlist, Hélène Boudin (2017)

131. High potassium conductance in astrocyte endfeet E. A. Newman (1986)

132. Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters L. Hertz (1979)

133. Enteric Glial Cells: Recent Developments and Future Directions Michel Neunlist, Malvyne Rolli-Derkinderen, Rocco Latorre, Laurianne Van Landeghem, Emmanuel Coron, Pascal Derkinderen, and Roberto De Giorgio (2014)

134. Ca^{2+} Responses in Enteric Glia Are Mediated by Connexin-43 Hemichannels and Modulate Colonic Transit in Mice Vladimir Grubišić* David Fried Roberto A. Gomez-Suarez Gina M. Leininger Jean Sévigny Vladimir Parpura Brian D. Gulbransen (2014)
135. Jejuno-ileitis fulminante a seguito di ablazione di glia enterica in topi transgenici adulti T G Cespuglio , T C Savidge, T C Freeman, H J Cox, E A Campbell, L Mucke, M H Johnson, M V Sofroniew (1998)
136. ipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin- 1β from enteric glial cells Matsuka Murakami, Toshio Ohta, Shigeo Ito (2009)
137. T cell activation by enteric glia — A novel pathway for the amplification of inflammatory responses in the enteric nervous system (ENS) Eike Hollenbach, Anne Ruhl, Margot Zoller, Wolfgang Stremmel (2000)
138. Molecular Signaling and Dysfunction of the Human Reactive Enteric Glial Cell Phenotype: Implications for GI Infection, IBD, POI, Neurological, Motility, and GI Disorders Andromeda Liñán-Rico, PhD, Fabio Turco, PhD, Fernando Ochoa-Cortes, PhD, Alan Harzman, MD (2016)
139. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration Robert E. Mrazek^{ad}W. Sue T. Griffin (2005)

140. Interleukin-1 Mediates Pathological Effects of Microglia on Tau Phosphorylation and on Synaptophysin Synthesis in Cortical Neurons through a p38-MAPK Pathway
Yuekui Li, Ling Liu, Steven W. Barger and W. Sue T. Griffin (2003)

141. Herpes Simplex Virus Type 1 Engages Toll Like Receptor 2 to Recruit Macrophages During Infection of Enteric Neurons

Paola Brun , Melania Scarpa , Chiara Marchiori , Jessica Conti , Andromachi Kotsafti , Andrea Porzionato , Raffaele De Caro , Marco Scarpa , Arianna Calistri , Ignazio Castagliuolo (2018)

142. TLR-Mediated Signal Transduction and Neurodegenerative Disorders
Shashank Vishwanath Adhikarla (2021)

143. The role of laminin in attachment, growth, and differentiation of cultured cells: a brief review Mats Paulsson (1992)

144. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining Kyuseok Im
Sergey Mareninov M. Fernando Palma Diaz William H. Yong (2018)

145. The real-time polymerase chain reaction

Mikael Kubista , José Manuel Andrade, Martin Bengtsson, Amin Forootan, Jiri Jonák, Kristina Lind, Radek Sindelka, Robert Sjöback, Björn Sjögreen, Linda Strömbom, Anders Ståhlberg, Neven Zoric (2006)

146. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration, Mrack, Griffin (2005)

147. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease
Georgia R. Frost and Yue-Ming Li (2017)

148. Enteric Glial Cells: Recent Developments and Future Directions - Michel Neunlist, Malvyne Rolli-Derkinderen, Rocco Latorre (2014)

149. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction

Marie Orre , Willem Kamphuis , Lana M Osborn , Anne H P Jansen , Lieneke Kooijman , Koen Bossers , Elly M Hol

150. Enteroglial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells Fabio Turco, Giovanni Sarnelli

151. Astrocytic expression of the Alzheimer's disease β -secretase (BACE1) is stimulus-dependent Maike Hartlage-Rübsamen, Ulrike Zeitschel, Jenny Apelt, Ulrich Gärtner, Heike Franke, Tobias Stahl, Albrecht Günther, Reinhard Schliebs, Milena Penkowa, Volker Bigl, Steffen Roßner

152. Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease Megan L. Steele^{ab} Stephen R. Robinson^c (2012)

153. Inhibition of TLR4 Induces M2 Microglial Polarization and Provides Neuroprotection via the NLRP3 Inflammasome in Alzheimer's Disease Weigang Cui , Chunli Sun , Yuqi Ma , Songtao Wang , Xianwei Wang , Yinghua Zhang (2020)

154. Brain Res Rev. 2009 Mar; 59 2: 278–292

RINGRAZIAMENTI

Un sincero grazie al professor Castagliuolo Ignazio per avermi dato la possibilità di questa esperienza, per i suoi preziosi consigli e per la fiducia nei miei confronti.

A Veronica Zatta: grazie per la tua pazienza, per gli innumerevoli insegnamenti e consigli sull'esecuzione degli esperimenti. Una spalla su cui ho sempre potuto contare in questi mesi.

Alla mia famiglia, per aver reso possibile tutto, per avermi supportata e aiutata nei momenti più difficili e consigliata in qualsiasi scelta che ho fatto e farò nella vita. Senza il vostro immenso puro amore che mi donate ogni giorno, non sarei la persona che sono oggi.

Alle mie amiche dell'Università, Elisa, Valentina, Giorgia e Irene: avete reso questi cinque anni a Padova, uno dei migliori periodi della mia vita. Le studiate insieme e le risate tra i banchi della DSFARM non li dimenticherò mai.

A Camilla, una compagna di vita, una vera Amica dal cuore e dall'animo sincero, con la quale ho condiviso i momenti più belli, più divertenti e spensierati. Grazie per esserci sempre stata in ogni periodo della mia vita.

Grazie al pattinaggio e a tutte le mie compagne di allenamento, per avermi insegnato ad organizzarmi ed a non mollare mai.



