

Studio dell'effetto profibrotico e antiangiogenetico del parvovirus B19: ruolo dell'infezione nella patogenesi della sclerosi sistemica.

Responsabile scientifico: prof.ssa Gabriella Fibbi

Relazione scientifica

Nell'ambito di tale progetto abbiamo effettuato e concluso lo studio relativo al ruolo del parvovirus B19 (B19V) nell'induzione della senescenza nei fibroblasti dermici umani come uno dei potenziali meccanismi coinvolti nel processo della fibrosi. I risultati della ricerca sono stati recentemente pubblicati sulla rivista *Rheumatology*

(Arvia et al., Parvovirus B19 (B19V) induces cellular senescence in human dermal fibroblasts: putative role in SSc-associated fibrosis *Rheumatology* 2021; 001-11 <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab904> Advance access publication 9 December 2021)

La senescenza cellulare è uno stato di arresto permanente del ciclo cellulare in cui le cellule senescenti non si replicano ma rimangono vitali e metabolicamente attive. I segni distintivi più caratteristici delle cellule senescenti sono: (1) un'attivazione persistente della risposta al danno del DNA (*DNA Damage Response: DDR*), (2) l'arresto permanente del ciclo cellulare, (3) cambiamenti morfologici caratterizzati dalla forma appiattita e allargata che assumono le cellule, (4) la vacuolizzazione e multinucleazione delle stesse, (5) l'aumento dei livelli di beta-galattosidasi associata alla senescenza (*Senescence-Associated beta-galactosidase: SA-β-GAL*), (6) l'up-regolazione dei fattori antiproliferativi e (7) l'acquisizione del fenotipo secretorio associato alla senescenza (*Senescence-Associated-Secretoty Phenotype: SASP*) caratterizzato dal rilascio di una varietà di citochine, di fattori di crescita, delle proteasi e delle chemochine [1].

Evidenze emergenti dimostrano, che un eccessivo accumulo di cellule senescenti è associato ad alcune malattie croniche e suggerisce un ruolo patogenetico della senescenza cellulare nel processo fibrotico, come quello che si verifica nell'invecchiamento o nella sclerosi sistemica (SSc) [2].

In questo studio le colture primarie di fibroblasti cutanei sono state infettate con B19V e analizzate per l'acquisizione di marcatori di senescenza, come le modificazioni morfologiche, l'attività della SA-β-GAL, la risposta al danno del DNA (DDR) e l'acquisizione del fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP).

Abbiamo dimostrato, che i fibroblasti dermici umani in coltura infettati con il B19V sviluppano una serie di caratteristiche tipiche delle cellule senescenti, simili a quelle osservate nei fibroblasti cutanei sclerodermici. In particolare, le cellule assumono una morfologia appiattita, allargata e presentano un'aumentata attività della SA- β -GAL. Mediante l'immunofluorescenza abbiamo dimostrato, che tale attività è associata alle cellule infettate, in quanto positive alle proteine capsidiche (VP1/VP2) virali. Tuttavia, l'elevata attività della SA- β -GAL è stata osservata anche in una percentuale delle cellule non infettate suggerendo, che l'infezione da B19V può innescare la senescenza che, per via paracrina, viene diffusa ad altre cellule.

Infatti, in uno studio precedente abbiamo dimostrato che il B19V attiva i fibroblasti dermici stimolando la produzione dei messaggeri per una serie di fattori tipici del fenotipo secretorio associato alla senescenza [3]. Nel presente studio abbiamo confermato, che le cellule infettate sviluppano il fenotipo *SASP-like* caratterizzato dall'espressione e secrezione di una serie di citochine ed accompagnata dall'attivazione e traslocazione nucleare del fattore NFkB.

Inoltre, abbiamo dimostrato, mediante il test *Comet*, che rispetto alle cellule non infettate, una sottopopolazione dei fibroblasti infettati presenta un livello significativamente più elevato delle rotture a carico del doppio filamento del DNA (*DNA strand breaks*), del danno ossidativo (*formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG)-sensitive sites*) e dell'attivazione del γ H2AX, un marcatore del danno a carico del DNA.

In complesso, questi risultati indicano, che il B19V è in grado di indurre la senescenza nei fibroblasti in coltura. La senescenza virus-indotta e la produzione di fattori *SASP-like* nei fibroblasti dermici normali potrebbe rappresentare un nuovo meccanismo patogenetico dell'infezione non produttiva da B19V con un potenziale ruolo nel processo fibrotico.

Nel corso dello svolgimento del progetto è stato inoltre avviato uno studio relativo al ruolo del B19V nella angiogenesi. Mediante il saggio di morfogenesi capillare su matrigel abbiamo osservato una spiccata inibizione della formazione di strutture simil-capillari con una riduzione significativa del numero di tubuli, di ramificazioni e della lunghezza totale dei tubuli nelle colture dei precursori endoteliali (*Endothelial Colony Forming Cells, ECFC*) infettate con il B19V rispetto alle cellule di controllo. Non sono state osservate invece differenze significative nell'organizzazione capillare tra le cellule endoteliali (*Human Microvascular Endothelial Cells: HMVEC*) di controllo ed infettate con B19V.

Le differenze nella formazione delle strutture simil-capillari su Matrigel tra le cellule endoteliali mature e i loro progenitori potrebbe far ipotizzare una differente espressione dei fattori pro- ed anti-angiogenici [4]. I risultati preliminari della RT-PCR comparativa suggeriscono, che nelle HMVEC l'espressione di geni con valenza anti-angiogenica: PTX3 e l'MMP12 è controbilanciata da un aumento del CTGF e della PLXBN1, entrambi con attività pro-angiogenica. L'infezione stimola inoltre l'espressione di alcuni geni dell'inflammasoma: IL1 β , Casp1 e AIM2.

Questi risultati sono preliminari e richiedono ulteriori conferme e approfondimenti.

Bibliografia

1. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, et al. Cell 2019; 179(4):813-27.
2. Schafer MJ, Haak AJ, Tschumperlin DJ, et al., Curr Rheumatol Rep 2018; 20(1):3.
3. Arvia R, Margheri F, Stincarelli MA et al. Rheumathology. 2020; 0:1-7.
4. Giusti B, Fibbi G, Margheri F et al. Arthritis Res Ther. 2006;8(4): R115.

Firenze, 31 dicembre 2021

prof.ssa Gabriella Fibbi

Handwritten signature of Gabriella Fibbi in black ink.