**Progetto di ricerca**

**Parvovirus B19: modelli in vitro per lo studio della trasmissione materno-fetale dell’infezione**

**Proponente:**

* Prof. Giorgio Gallinella, Dip. di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna

**Scopo del progetto**

Il Parvovirus B19 (B19V) è un virus patogeno per l’uomo ampiamente diffuso, responsabile di diverse manifestazioni cliniche le cui caratteristiche dipendono dallo stato fisiologico e dal grado della risposta immunitaria dell’individuo infettato. L’infezione contratta dalle donne in gravidanza pone un elevato rischio di trasmissione intrauterina e di danno al feto, con una mortalità fetale stimata circa al 10%. La patogenesi è principalmente una conseguenza del tropismo selettivo di B19V per le cellule progenitrici nella linea eritroide (EPC). In queste il B19V esercita un effetto citotossico con blocco dell’eritropoiesi che si traduce nel feto in anemia, ipossia tissutale, idrope non immune e/o morte intrauterina [1-3]. I meccanismi che consentono al virus di attraversare la barriera placentare, il ruolo dei trofoblasti e gli effetti protettivi conferiti della immunità materna, non sono stati ancora studiati in modo approfondito.

Il progetto di ricerca ha l’obiettivo di investigare i meccanismi ancora non noti della trasmissione materno-fetale del Parvovirus B19, in particolare lo studio mediante utilizzo di modelli cellulari in vitro dei meccanismi di passaggio del virus attraverso la barriera placentare, la definizione del ruolo dei trofoblasti placentari nella trasmissione e nella patogenesi del danno fetale, e la delucidazione dei meccanismi di protezione conferita dagli anticorpi nel sangue materno.

**Basi scientifiche**

La trasmissione materno fetale dell’infezione da B19V è ben documentata a livello clinico ma scarsamente investigata a livello cellulare e virologico. Gli scarsi dati di letteratura suggeriscono che il virus circolante nel sangue materno possa legarsi al globoside, un glicolipide di membrana che agisce come primo recettore, presente sui citotrofoblasti e sinciziotrofoblasti dei villi placentari, prima di essere trasferito nel versante fetale della placenta [4-6]. Le cellule endoteliali capillari dei villi placentari, già identificate come cellule permissive all’infezione virale [7], possono contribuire alla patogenesi permettendo al virus una fase replicativa prima dell’ingresso nella circolazione fetale e l’infezione delle cellule progenitrici eritroidi.

Nella trasmissione materno fetale dell’infezione, come già studiato in altri casi [8], il virus può coinvolgere più tipi di cellule presenti nei villi placentari, sia nel versante materno che fetale, prima di raggiungere il compartimento eritroide in un contesto di forte espansione e sviluppo, e di un sistema immunitario ancora immaturo nel neutralizzare il virus. Ad oggi però i meccanismi di trasporto del B19V attraverso la barriera placentare e quali cellule siano coinvolte nella trasmissione materno-fetale non sono provati da evidenze sperimentali. La pregressa immunità materna con IgG specifiche conferisce protezione all’infezione fetale, ma non è noto il meccanismo di neutralizzazione dell’infettività, e quale sia il titolo anticorpale minimo protettivo in funzione della carica virale.

**Metodologie adottate**

Il progetto di ricerca propone lo sviluppo di modelli cellulari in vitro costituiti da i) colture di trofoblasti umani, in monostrato non polarizzato e ii) colture di trofoblasti polarizzati mediante crescita cellulare su membrane porose in poliestere (Transwell system). Saranno utilizzate le cellule BeWo (ATCC CCL-98), trofoblasti da coriocarcinoma umano, generalmente scelte come sistema modello di barriera placentare, già in uso nel laboratorio proponente [9]. Le BeWo, in seguito a trattamenti con l’agente chimico forskolina, possono differenziare e maturare in sinciziotrofoblasti [10], tipici della placenta matura, offrendo quindi la possibilità di studiare i meccanismi di trasporto attraverso la barriera materno-fetale a diversi stadi di sviluppo. (1) La crescita di cellule BeWo in monostrato non polarizzato avverrà su Chamber Slide System. Le cellule saranno trattate con forskolina per indurre il differenziamento e la formazione di sincizi. L’avvenuto differenziamento sarà confermato in immunofluorescenza indiretta utilizzando anticorpi specifici per le giunzioni cellulari e in un sistema di imaging multiplex saranno ulteriormente impiegati anticorpi per evidenziare il recettore del B19V (globoside). (2) La crescita di cellule BeWo in monostrato polarizzato avverrà su Transwell system. Il differenziamento sarà valutato come in precedenza, mentre l’integrità del monostrato sarà valutato mediante misurazione della resistenza elettrica transepiteliale (TEER) [11].

Le cellule così coltivate saranno infettate sperimentalmente con B19V. Per l’inoculo si utilizzerà un virus ottenuto in vitro da un genoma sintetico di B19V, una competenza specifica del laboratorio proponente [12]. L’utilizzo di virus ottenuto in coltura, libero da ogni interferenza dovuta a sostanze contaminanti nelle matrici biologiche, sarà ottimale per il disegno sperimentale. Le cellule infettate saranno analizzate a diversi tempi per valutare la dinamica di trasporto intracellulare, una eventuale capacità replicativa e il relativo profilo di espressione virale. Allo scopo, saranno utilizzate in maniera combinata: (i) tecniche di Fluorescent In Situ Hybridisation (FISH) rivolte alla rivelazione del genoma virale; (ii) tecniche di immunofluorescenza indiretta (IIF) per l’identificazione di proteine virali e/o cellulari; (iii) tecniche molecolari quantitative (qPCR, qRT-PCR) per la definizione della abbondanza genica e del profilo di espressione virale. Inoltre, l’utilizzo del sistema transwell consentirà di valutare la cinetica di trasporto attraverso il monostrato di cellule BeWo mediante analisi quantitativa del DNA di B19V recuperato dal terreno di crescita nella camera apicale e in quella basolaterale del transwell.

L’efficacia protettiva di anticorpi anti-B19V sarà valutata in esperimenti di neutralizzazione dell’infettività, con infezione delle cellule BeWo previa incubazione del virus con immunoglobuline. Allo scopo possono essere usate le immunoglobuline umane (IVIG), normale presidio terapeutico contro il virus. Utilizzando i sistemi sperimentali precedentemente descritti sarà possibile valutare la capacità protettiva e i possibili meccanismi, come una diminuzione della capacità del virus di legarsi o penetrare nelle colture cellulari BeWo in monostrato, una diversa processazione e traffico del virus internalizzato, o una variazione nella trasmissibilità determinata nel sistema Transwell.

**Risultati attesi**

I risultati ottenuti permetteranno di delucidare i processi alla base della trasmissione materno fetale di infezione, in particolare: i) valutazione della presenza di recettori virali nei trofoblasti placentali, a differenti stadi di differenziamento e possibile correlazione con la suscettibilità fetale all’infezione virale; ii) valutazione del ruolo dei trofoblasti nel traffico dei virus attraverso la barriera materno-fetale, come tessuto permeabile o eventualmente come bersaglio di infezione produttiva o abortiva; iii) caratterizzazione dei meccanismi di protezione anticorpale, e della potenza neutralizzante l’infettività, in relazione alla carica virale.

**Impatto della ricerca proposta**

Il progetto proposto ha un forte impatto sia per la ricerca di base che traslazionale. Le conoscenze ottenute contribuiranno a definire il meccanismo di trasporto di B19V attraverso la barriera materno-fetale, uno degli aspetti più rilevanti ma meno investigati per la patogenicità di questo virus e il suo impatto sulla salute. Sarà possibile chiarire il ruolo dei trofoblasti nei meccanismi di traffico intracellulare o di permissività alla replicazione prima del rilascio del virus nella circolazione fetale. Il sistema sperimentale renderà possibile investigare e valutare l’efficacia dei meccanismi di protezione operati dagli anticorpi materni nei confronti dell’infezione intrauterina. In assenza di un vaccino, le informazioni ottenute potranno essere di fondamentale importanza nella ottimizzazione dell’efficacia di interventi terapeutici atti a prevenire o contrastare l’infezione intrauterina e utilizzati fino ad oggi su base empirica, come le immunoglobuline per uso endovenoso (IVIG), così come nello sviluppo di nuove possibili strategie profilattiche e antivirali incluso l’utilizzo di anticorpi monoclonali umani.

**Svolgimento del progetto e piano delle attività**

L’assegnista dovrà possedere conoscenze teoriche e capacità da consentire di condurre, nell’arco dei 12 mesi previsti dal progetto, le seguenti attività:

* Allestimento di colture di cellule BeWo
* Preparazione stock virale di parvovirus B19 per esperimenti di infezione in vitro;
* Esperimenti di infezione di cellule, analisi molecolari (qPCR, qRT-PCR), biochimiche e di imaging cellulare multianalita
* Analisi critica ed elaborazione dati
* Pubblicazione dei risultati dello studio mediante comunicazione a congresso e redazione lavoro per pubblicazione scientifica su rivista con impact factor

**Riferimenti bibliografici selezionati**

1. Gallinella, G. Parvovirus B19 Achievements and Challenges. ISRN Virology, 2013: p. 10.5402/2013/898730

2. Qiu, J., M. Soderlund-Venermo, and N.S. Young. Human Parvoviruses. Clin Microbiol Rev, 2017. 30(1): p. 43-113

3. Bonvicini, F., Bua, G., Gallinella, G. Parvovirus B19 infection in pregnancy – awareness and opportunities. Curr Opin Virol, 2017.27; p. 8-14.

4. Jordan, J.A. and J.A. DeLoia. Globoside expression within the human placenta. Placenta, 1999. 20(1): p. 103-8.

5. Wegner, C.C. and J.A. Jordan, Human parvovirus B19 VP2 empty capsids bind to human villous trophoblast cells in vitro via the globoside receptor. Infect Dis Obstet Gynecol, 2004. 12(2): p. 69-78.

6. Jordan, J.A. and Butchko A.R. Apoptotic activity in villous trophoblast cells during b19 infection correlates with clinical outcomes: assessment by the caspase-related M30 CytoDeath antibody. Placenta, 2002. 23: p. 547-553.

7. Pasquinelli, G., et al., Placental endothelial cells can be productively infected by Parvovirus B19. J Clin Virol, 2009. 44(1): p. 33-8.

8. Arora, N., Sadovsky, Y., Dermody, T. S. & Coyne, C. B. 2017. Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. Cell Host Microbe, 21, 561-567.

9. Bode, C.J., Jin, H., Rytting, E., Silverstein, P.S., Young, A.M., Audus, K. n Vitro Models for Studying Trophoblast Transcellular Transport. Methods Mol Med, 2006. 122: p. 225-239.

10. Yoshie, M., Kaneyama, K., Kazuya, K., et al. Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells. Hum Reprod, 2010. 25(9): p. 2229-2238.

11. Huang, X. Luthi, M., Ontsouka, E.C., et al. Establishment of a confluent monolayer model with human primary trophoblast cells: novel insights into placental glucose transport. Mol Hum Reprod, 2016. 22(6): p. 442-456

12. Manaresi, E., Conti, I., Bua, G., Bonvicini, F., Gallinella, G. A Parvovirus B19 synthetic genome: sequence features and functional competence. Virology, 2017. 508: p. 54-62.