

25.Novembre

Un modello innovativo per comprendere il “mistero” del neurotropismo pandemico

*Quello che è più incomprensibile
è che ci sia ancora qualcosa di comprensibile.*
Albert Einstein

Premessa:

Sebbene SARS-CoV-2 colpisca principalmente il sistema respiratorio, alcuni pazienti con COVID-19 possono presentare anche sintomi extrarespiratori, comprese manifestazioni neurologiche come perdita dell'olfatto (anosmia) e del gusto (ageusia), mal di testa, affaticamento, disturbi della memoria, vomito, disturbi dell'andatura e disturbi della coscienza. Questi dati suggeriscono che SARS-CoV-2 può infettare la rete neuronale del cervello umano. Alcuni studi hanno riportato la presenza di SARS-CoV-2 nei *neuroni sensoriali olfattivi (OSN)* e in casi di COVID-19 casi fatali, interessare zone più profonde all'interno del sistema nervoso centrale (SNC). Tuttavia, il neurotropismo di SARS-CoV-2 e il suo ruolo diretto dell'infezione del SNC e nella patogenesi delle manifestazioni neurologiche rimane molto controverso ed in larga parte “misterioso”.

Guilherme Dias de Melo *del Unità di Epidemiologia e Neuropatologia del Lyssavirus, Institut Pasteur di Parigi* ha dimostrato come la mucosa olfattiva di pazienti che mostravano una persistenza a lungo termine dell'anosmia associata a COVID-19 rivelava la presenza di trascritti virali e di cellule infette da SARS-CoV-2, insieme a un'inflammation estesa e prolungata (de Melo GD et al. 2021) .

La necessità di un modello appropriato

Nonostante la disponibilità di vaccini efficaci contro SARS-CoV-2, sappiamo ancora poco sulla patogenesi del COVID-19. La disponibilità di modelli animali “manipolabili” allo scopo di evidenziare aspetti virologici, immunologici e patogenetici dell'infezione da SARS-CoV-2 e dei futuri coronavirus umani potrebbero fornire informazioni preziose per comprendere il neurotropismo di Sars-cov-2.

Il ruolo dei topi transgenici

I topi da laboratorio *wild-type* sono scarsamente suscettibili all'infezione da SARS-CoV-2 perché *l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE 2)* del topo non agisce come recettore cellulare per il virus. Tuttavia sono disponibili diversi lignaggi di *topi transgenici* che esprimono la versione umana del recettore SARS-CoV-2 (*hACE2*) e pertanto supportano la replicazione virale e riproponendo così alcune caratteristiche cliniche dell'infezione umana (Muñoz-Fontela C, 21) .

Nel febbraio 2020, l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ha riunito un gruppo di ricercatori internazionale per un progetto mirato a sviluppare modelli animali per COVID-19 nell'ottica di accelerare la sperimentazione di vaccini e sviluppare nuovi agenti terapeutici. In quella occasione è stata istituita una task force coordinata da **César Muñoz-Fontela** *del Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine*, di Amburgo , con l'obiettivo di ottimizzare la produzione di topi transgenici umanizzati.

Il “modello” più studiato è il topo **transgenico K18-hACE2**, che esprime *hACE2* prevalentemente nelle cellule epiteliali la cui espressione è sotto il controllo del promotore della *citocheratina 18 (KRT18)*. I topi **K18-hACE2** sono in genere infettati mediante *instillazione intranasale* con sospensioni liquide di SARS-CoV-2 in anestesia profonda.(McCray PB Jr, et al 2007)

Una infezione “esagerata”

Questo purtroppo determina una infezione del sistema nervoso centrale eccessiva e sproporzionata che portainevitabilmente alla formazione di una *encefalite fatale*, condizione che si verifica raramente nei pazienti con COVID-19.

Questa “*prorompente neuroinvasione*” virale sostiene **Pratima Kumari** del *Department of Biology, dell'Università di Atlanta* limita gravemente l'utilizzo di questi modelli murini, ostacolando gli studi sulla patogenesi della malattia (comprese le conseguenze a lungo termine dell'infezione da SARS-CoV-2) e sulla sperimentazione farmacologia (Kumari P et al)

Il team del San Raffaele di Milano coordinato da **Valeria Fumagalli** ha pubblicato ieri, 23 novembre 2021, su *Science immunology* il report: *Administration of aerosolized SARS-CoV-2 to K18-hACE2 mice uncouples respiratory infection from fatal neuroinvasion* che descrive una piattaforma COVID-19 alternativa, basata sull'esposizione controllata di **aerosol** a topi *transgenici K18-hACE2* a SARS-CoV-2. I topi, infettati tramite **aerosol**, sviluppano una robusta infezione respiratoria, *anosmia* e segni di ostruzione delle vie aeree ma, contrariamente ai topi infettati per via intranasale, non danno una neuroinvasione fatale. (Fumagalli V et al 2021).

Il lavoro dimostra molto elegantemente che l'inoculazione intranasale, ma non l'esposizione ad **aerosol**, di SARS-CoV-2 porta ad una *neuroinvasione fatale* nei topi transgenici **K18-hACE2** mentre l'esposizione via **aerosol** a topi transgenici porta a un'efficace infezione respiratoria, anosmia e deposizione *di fibrina* nel polmone.

COVID-19, in particolare nelle sue forme più gravi, è stato associato a *fenomeni trombotici* che comportano una aumentata *attivazione piastrinica* e relativa aggregazione, associata a depositi diffusi di fibrina negli alveoli polmonari.

Il team del San Raffaele ha valutato la *funzione piastrinica* attraverso *l'aggregometria a trasmissione luminosa* del plasma ricco di piastrine (PRP) ottenuto da topi infetti.

Mentre l'infezione da inoculo ha provocato *un'aggregazione piastrinica* significativamente ridotta, il PRP di topi infetti da **aerosol** hanno mostrato un'aggregazione normale o addirittura aumentata. È interessante notare che questo è stato associato ad un aumento della deposizione di fibrina e ad aggregati piastrinici più grandi nei polmoni dei topi con infezione.

Valutati complessivamente i dati indicano che l'esposizione ad aerosol di topi transgenici K18-hACE2 a SARS-CoV-2 si traduce in una robusta replicazione virale nel tratto respiratorio, anosmia, ostruzione delle vie aeree e aggregazione piastrinica con deposizione di fibrina nel polmone.

L'osservazione che i topi infettati dall'esposizione ad **aerosol** sviluppano anosmia in assenza di neuroinvasione confermano i dati clinici del team di **Carole Sudre** della *School of Biomedical Engineering & Imaging Sciences, King's College London, London*, che dimostrano come la disfunzione olfattiva sia un sintomo forte e coerente associato a un test COVID-19 positivo nell'uomo (Sudre CH et al 2021) .

Una possibile patogenesi dell' anosmia: le cellule sustentcolari

La fisiopatologia dell'anosmia innescata da SARS-CoV-2 rimane poco chiara. Tuttavia, i dati disponibili supportano l'ipotesi che l'anosmia derivi dall'infezione delle *cellule sustentcolari* e/o delle *ghiandole di Bowman* piuttosto che dal coinvolgimento dei *neuroni sensoriali olfattivi*.

Leon Fodoulian del *Department of Genetics and Evolution, Faculty of Sciences, dell'Università di Ginevra* ha dimostrato che le *cellule sustentcolari* e le *ghiandole di Bowman* sia nei topi transgenici **K18-hACE2** che nell'uomo, esprimono alti livelli del recettore SARS-CoV-2 ACE2 e del potenziatore di internalizzazione TMPRSS2 (Fodoulian L 2020)

Le **cellule sustentaculari** infette e/o le **ghiandole di Bowman** possono a loro volta produrre citochine pro-infiammatorie che alterano l'attività dei **neuroni sensoriali olfattivi**. In alternativa, **cellule sustentacolari** danneggiate e/o **ghiandole di Bowman** possono portare a una disorganizzazione generale dell'epitelio olfattivo, determinando una trasduzione del segnale difettosa al **bulbo olfattivo** come descritto da **Bertrand Briche** dell' *Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM di Parigi* (Bryche B et al . 2020).

La differenza nell'infiltrazione immunitaria nei polmoni tra infezione intranasale e **aerosol** (nonostante cariche virali simili) è ancora poco conosciuta.

Christian Meisel del *Department of Medical Immunology, Charité, Humboldt University, Berlin*. ipotizza che una possibile spiegazione risiede nel danno al sistema nervoso centrale associato ad immunodeficienza. Allo stesso modo, le modifiche **dell'aggregazione piastrinica** potrebbe essere ricondotte ad un danno al sistema nervoso centrale.

Istillazione nasale versus aerosol

Precedenti studi hanno esaminato come la via di inoculazione influenza la risposta immunitaria e l'esito della malattia in caso di infezione virale. Ad esempio, uno studio coordinato da **Jenifer Smith** del *Department of Infectious Diseases, University of Georgia* ha confrontato direttamente l'instillazione intranasale **con l'inoculazione di aerosol** di topi con virus dell'influenza e ha concluso che la somministrazione di aerosol ha provocato un'infezione più robusta, con relativa infiltrazione e infiammazione delle cellule polmonari alveolari ed una accentuata morbilità (Smith J 2010)

Conclusioni:

Il modello proposto dal San Raffaele può finalmente integrare la ricerca sulla trasmissione virale (ad esempio, analizzando l'effetto della dimensione delle particelle di aerosol, dell'umidità e della temperatura sull'infettività), sulla patogenesi della malattia (inclusi, potenzialmente, eventi trombotici e conseguenze a lungo termine dell'infezione) e su possibili interventi terapeutici.

In particolare può costituire un valido sistema sperimentale per indagare i meccanismi alla base del neurotropismo pandemico.

Riferimenti:

-Fumagalli V et al.

Administration of aerosolized SARS-CoV-2 to K18-hACE2 mice uncouples respiratory infection from fatal neuroinvasion *SCIENCE IMMUNOLOGY*•23 Nov 2021

-de Melo GD, Lazarini F et al . **COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters**. *Sci Transl Med*. 2021 Jun 2;13(596):eabf8396

-Muñoz-Fontela C et al. **Models for COVID-19**. *Nature*. 2020 Oct;586(7830):509-515.

-McCray PB Jr et al. **Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus**. *J Virol*. 2007 Jan;81(2):813-21.

-Kumari P et al. **Neuroinvasion and Encephalitis Following Intranasal Inoculation of SARS-CoV-2 in K18-hACE2 Mice**. *Viruses*. 2021 Jan 19;13(1):132.

-Sudre CH et al. **Anosmia, ageusia, and other COVID-19-like symptoms in association with a positive SARS-CoV-2 test, across six national digital surveillance platforms: an observational study**. *Lancet Digit Health*. 2021 Sep;3(9):e577-e586.

-Fodoulian L et al **SARS-CoV-2 Receptors and Entry Genes Are Expressed in the Human Olfactory Neuroepithelium and Brain**. *Science*. 2020 Dec 18;23(12):101839

-Bryche B et al. **Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters**. *Brain Behav Immun*. 2020 Oct;89:579-586.

-Meisel C et al. **Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome**. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Oct;6(10):775-86.

-Smith JH et al. **Aerosol inoculation with a sub-lethal influenza virus leads to exacerbated morbidity and pulmonary disease pathogenesis**. *Viral Immunol*. 2011 Apr;24(2):131-42.