

Relazione scientifica e rendicontazione delle attività di ricerca

Progetto: “Riattivazione di HSV-1 e rischio di Alzheimer: terapia immunologica come strategia di intervento”

Fondazione di Ricerca Virologica Oretta Bartolomei Corsi

Responsabile scientifico: Dott.ssa Elena Criscuolo, PhD
Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Università Vita-Salute San Raffaele

*Documento riservato a uso interno della Fondazione — contiene dati preliminari non ancora pubblicati.
Si richiede di non diffondere pubblicamente questa versione.*

1. Introduzione e razionale scientifico

Negli ultimi anni si è consolidata l'ipotesi secondo cui infezioni croniche, inclusa quella da Herpes Simplex Virus di tipo 1 (HSV-1), possano contribuire allo sviluppo della malattia di Alzheimer (AD). Secondo la cosiddetta “infection-trigger hypothesis”, la produzione di amiloide- β e di proteina Tau fosforilata (pTau) rappresenterebbe una risposta immunitaria a patogeni persistenti nel sistema nervoso centrale; le riattivazioni ricorrenti di HSV-1, favorite da stress, invecchiamento e declino immunitario, contribuirebbero a neuroinfiammazione cronica e declino cognitivo.

Evidenze cliniche recenti (Vestin et al., J Alzheimers Dis 2024) mostrano che titoli più elevati di anticorpi anti-HSV intratecali correlano con una maggiore patologia Tau e con una riduzione del metabolismo glucidico cerebrale, e che l'infezione da HSV raddoppia il rischio di demenza in coorti prospettiche di soggetti anziani.

A livello di modelli in vitro, la letteratura recente ha inoltre dimostrato che: (i) il pretrattamento con Tau fosforilata sintetica riduce significativamente infezione, conta delle placche e crescita delle placche da HSV-1 in colture neuronali umane; (ii) i neuroni non infetti in prossimità di cellule infette mostrano un aumento dei livelli di pTau, suggerendo un meccanismo di segnalazione protettiva cellula-cellula; (iii) i capsidi di HSV-1 fungono da nucleo di aggregazione per fibrille di Tau, come osservato mediante microscopia elettronica a trasmissione (Vestin et al., 2024; Heumüller et al., bioRxiv 2026).

2. Ipotesi di lavoro del progetto

Sulla base di queste evidenze, il progetto ha articolato la propria ipotesi di lavoro su due assi di danno neuronale indotto da HSV-1 (Chauhan et al., Mol Neurobiol 2025):

- Danno diretto: dovuto al ciclo replicativo litico durante le riattivazioni e ad alterazioni metaboliche indotte dall'infezione latente
- Danno indiretto: dovuto a infiammazione cronica e attivazione microgliale, con conseguente compromissione della barriera emato-encefalica (BBB)

3. Attività svolte e risultati ottenuti

3.1 Danno diretto — Ciclo replicativo litico: pTau come possibile risposta antivirale

In cellule SH-SY5Y differenziate, l'infezione attiva da HSV-1 (VP26, 1 MOI, 48 hpi) induce un aumento significativo dei livelli di pTau rispetto alle cellule non infette.

In esperimenti di overespressione, la Tau, sia nella forma wild-type sia nella variante patologica P301L, ha mostrato una marcata attività antivirale: il titolo di HSV-1 HF è sceso da circa $2,2 \times 10^4$ TCID₅₀/mL a livelli non rilevabili (10 MOI, pretrattamento di 24 ore). L'effetto è risultato indipendente dalla mutazione, indicando che si tratti di una funzione “core” della proteina Tau,

probabilmente legata all'aggregazione indotta dall'overespressione, piuttosto che di una proprietà specifica della forma patologica.

3.2 Danno diretto — Diffusione cellula-cellula (cell-to-cell spreading)

È stato messo a punto un sistema reporter a doppio split (luciferasi NanoLuc e proteina mNeonGreen, ancorati a leucine zipper bFos-bJun) per quantificare la fusione cellulare indotta dal virus. Il sistema ha permesso di dimostrare che:

- la diffusione cellula-cellula di HSV-1 è efficiente e ceppo-specifica, sia in cellule SH-SY5Y sia in neuroni differenziati (il ceppo HSV-1 HF risulta significativamente più efficiente dei ceppi LV, KOS e RY)
- il fenomeno è confermato anche in progenitori neurali (NPC) mediante immunofluorescenza
- l'anticorpo monoclonale umano anti-gD (IgG#33; Clementi N, Criscuolo E, et al., Antiviral Res. 2017) blocca efficacemente le connessioni cellula-cellula mediate da HSV-1, fornendo la prima prova di concetto del coinvolgimento di gD nella fusione di membrana tra neuroni derivati da iPSC, un meccanismo non descritto finora in questo contesto

3.3 Danno diretto — Alterazioni metaboliche da infezione latente

Mediante imaging confocale di HSV-1 ricombinante (VP26-mRFP, proteina del capside; VP16-EYFP, proteina del tegumento) in presenza o assenza di ACV, utilizzato per indurre la latenza, è stata caratterizzata la diversa localizzazione subcellulare delle proteine virali nei due stati infettivi.

Nelle cellule con infezione latente è stata osservata una modesta espressione di gD in superficie (non statisticamente significativa) e nessuna differenza significativa nei livelli di pTau rispetto alle cellule non infette — a differenza dell'infezione litica, in cui gD, VP26 e pTau risultano tutti significativamente aumentati.

Questi dati supportano un modello di lavoro secondo cui, anche in assenza di replicazione litica completa, l'espressione di gD sulla superficie della cellula latentemente infetta potrebbe mediare il riconoscimento di nectina-1 sulle cellule adiacenti, favorendo il contatto cellula-cellula e, in presenza di gB, la fusione e la conseguente diffusione di pTau: un meccanismo potenzialmente bloccabile a livello dell'interazione gD-nectina, target dell'anticorpo IgG#33.

3.4 Danno indiretto — Infiammazione cronica e barriera emato-encefalica

È stato implementato, in collaborazione, un modello di barriera emato-encefalica completamente umano, basato su assembloidi derivati da cellule staminali pluripotenti (thBBBA — Iannielli et al., bioRxiv 2025), che ha mostrato:

- integrità di barriera potenziata, con TEER significativamente più elevata e permeabilità inferiore rispetto a monostrati endoteliali standard
- trasportatori funzionali, con efflusso attivo della P-glicoproteina e transitosi recettore-mediata
- struttura matura, con giunzioni serrate e composizione tri-cellulare stabile, mantenute per almeno 8 settimane

Il modello thBBBA è stato impiegato per riprodurre sia la riattivazione litica sia l'infezione latente di neuroni e cellule gliali, e per valutare l'impatto dell'infezione sulla popolazione e sulla dinamica delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) attraverso la barriera. Sia il trattamento con ACV sia con IgG#33 hanno permesso di mantenere la permeabilità della barriera a livelli comparabili al controllo sano, contrastando l'effetto disgregante dell'infezione, e hanno mostrato un'attività immunomodulante sul reclutamento e sulla proliferazione delle PBMC.

4. Conclusioni

- la trasmissione cellula-cellula di HSV-1 durante la riattivazione è ceppo-specifica e può facilitare la diffusione di pTau tra neuroni; questo meccanismo è efficacemente bloccato dall'anticorpo monoclonale IgG#33
- durante la latenza non si osservano differenze nei livelli di pTau, ma l'espressione differenziale di gD suggerisce comunque un possibile legame meccanicistico tra infezione persistente e neurodegenerazione
- sia ACV sia IgG#33 proteggono l'integrità della barriera emato-encefalica dall'effetto dell'infezione
- i trattamenti sistemici modulano il reclutamento e la proliferazione delle PBMC, mostrando un'attività che va oltre il semplice effetto antivirale diretto

5. Disseminazione dei risultati

I risultati preliminari del progetto sono stati presentati in occasione di:

- 2nd Junior Group Workshop for the European Society for Virology “Imaging Viruses”, 9-10 febbraio 2026, CBMSO-CSIC, Madrid (presentazione orale: *Multimodal Imaging of HSV-1 Intercellular Spread: Linking Viral Transmission and Tau Propagation in Neuronal Networks*)
- Viruses 2026: New Horizons in Virology, 11-13 marzo 2026, Barcellona (poster: *Dissecting HSV-1 Latency and Reactivation: A Reporter-Based Approach to Neuronal Communication and Protein Aggregation*)
- 1st International Workshop “Virus and Brain”, 2-3 giugno 2026, Montpellier (poster: *Decoding HSV-1 Cell-to-Cell Transmission in Human-Relevant Neuronal Models*)

La partecipazione a questi congressi internazionali ha costituito un'occasione fondamentale per la disseminazione dei risultati, il confronto con la comunità scientifica internazionale e la costruzione di nuove collaborazioni.

6. Rendicontazione e giustificazione del budget

6.1 Consumabili

Le risorse destinate ai consumabili sono state impiegate per la prosecuzione delle validazioni in vitro sui modelli di infezione e riattivazione neuronale (colture cellulari primarie e differenziate, stock virali, reagenti per immunofluorescenza e western blot, anticorpi, costrutti reporter, kit per saggi di luciferasi e per la quantificazione di pTau).

6.2 Beni inventariabili — sistema IVTech per la modellizzazione della barriera emato-encefalica

L'acquisizione del sistema IVTech ha permesso l'implementazione del modello di barriera emato-encefalica su transwell (thBBBA) descritto al paragrafo 3.4, che ha costituito uno strumento centrale del progetto per lo studio dell'infiammazione cronica e del danno indiretto indotto da HSV-1. Il sistema ha consentito la generazione riproducibile di assembloidi multi-cellulari (cellule endoteliali, periciti, astrociti) e la misura in continuo dei parametri di integrità di barriera (TEER, permeabilità), risultando un investimento strumentale con ricadute direttamente verificabili sui risultati ottenuti.

6.3 Disseminazione — partecipazione a congressi internazionali

Le spese di disseminazione sono state destinate alla partecipazione ai congressi internazionali sopra citati (2nd Junior Group Workshop ESV, Madrid, febbraio 2026; Viruses 2026: New Horizons

in Virology; 1st International Workshop Virus and Brain, Montpellier 2026), fondamentali per la presentazione e la valorizzazione dei risultati ottenuti, oltre che per l'aggiornamento scientifico e l'avvio di nuove collaborazioni internazionali.

6.4 Stabulario e sperimentazione in vivo — richiesta di rimodulazione del budget

Come già anticipato e concordato via e-mail con la Fondazione, in fase di pianificazione del progetto era prevista l'attivazione di esperimenti in vivo. Tuttavia, non è stato possibile avviare l'iter autorizzativo ministeriale in tempi utili, in quanto era necessario acquisire preliminarmente i risultati delle validazioni in vitro descritte ai paragrafi precedenti, indispensabili per definire in maniera solida il protocollo sperimentale da sottoporre alle autorità competenti. A tal fine, sin dal febbraio 2026 erano state avviate le procedure per formalizzare una collaborazione con il Dr. Harshnoviz (Human Technopole); l'accordo, tuttavia, non è ancora stato finalizzato dai rispettivi uffici legali. Per non rallentare l'avanzamento del progetto, è stata quindi attivata una collaborazione interna all'Università Vita-Salute San Raffaele, che ha permesso di accedere a cellule neuronali umane e di ottenere i risultati descritti nella presente relazione, particolarmente promettenti. Considerati i tempi necessari per la definizione dell'accordo con Human Technopole e per il successivo ottenimento delle autorizzazioni ministeriali, non è stato possibile completare gli esperimenti nel modello animale entro la scadenza del finanziamento.

Milano, 19 giugno 2026



Elena Criscuolo, PhD
Assistant Professor of Microbiology and Virology (RTD-A)
Laboratory of Microbiology and Virology
Vita-Salute San Raffaele University
Phone: +39 0226436209