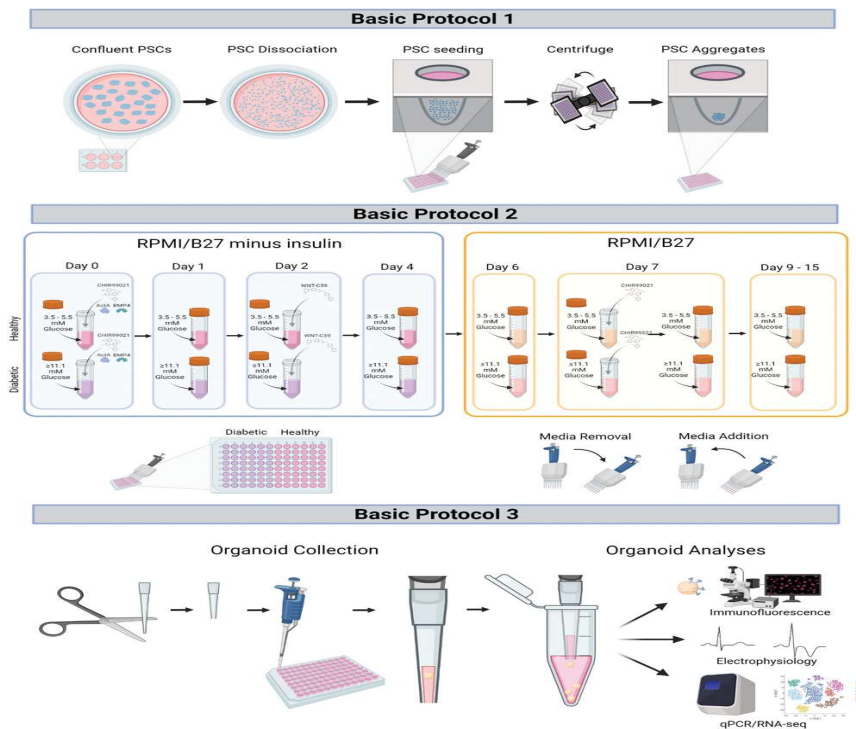


Cari Osanti,

ben trovati! In questo numero vedremo per prima cosa l'impiego dei NAM per indagare le correlazioni esistenti tra il diabete pre-gestazionale e l'insorgenza di malformazioni cardiache fetali; passeremo poi ad esaminare come le metodologie alternative ci aiutano nell'evidenziare il ruolo dell'epigenetica in numerose forme tumorali. Andremo quindi a capire lo stato dell'arte per quanto riguarda la validazione dei test tossicologici condotti con metodiche che non prevedono l'impiego di animali.

## Diabete pre-gestazionale e malformazioni cardiache fetali

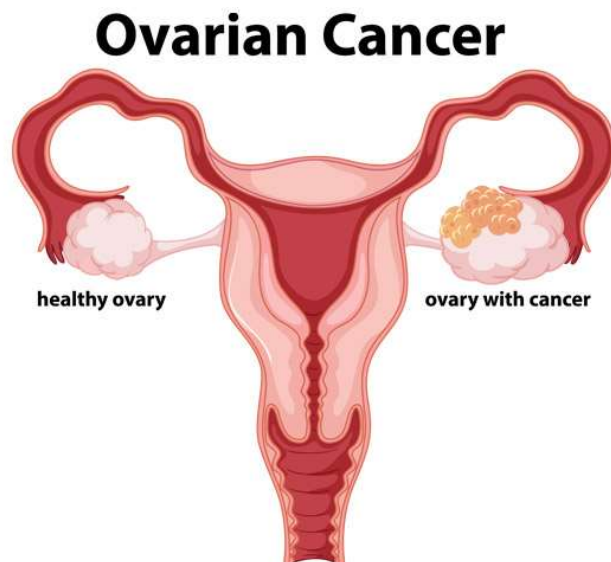


I difetti cardiaci congeniti costituiscono le anomalie congenite più diffuse nell'uomo. Il diabete pregestazionale definito tale se presente prima della gravidanza e nel primo trimestre della medesima (sia di tipo 1 che di tipo 2), rappresenta uno delle cause principali di origine non genetica, alla base delle anomalie cardiache fetali e il numero delle donne fertili che ne sono affette è in continuo aumento. Numerosi tentativi di scoprire l'origine della correlazione tra diabete e malformazioni cardiache, sono stati effettuati mediante modelli animali. **Tuttavia i limiti di tali studi sono stati considerevoli, e i dati ricavati non hanno messo in luce le correlazioni biochimiche di base tra le due patologie, così come sono rimaste inesplorate le differenze tra modelli animali (ratti nel caso specifico) e uomo: nelle due specie si riscontra infatti un diverso utilizzo del glucosio, del lattato, dei corpi chetonici e degli acidi grassi.** Poco rilevanti per questo studio anche i metodi classici in vitro, che ripropongono condizioni diabetiche molto severe e non necessariamente rispondenti alle situazioni in vivo. Sulla scorta delle più recenti tecnologie di proliferazione cellulare 2D/3D a partire da cellule staminali pluripotenti indotte umane è stato creato un organoide di cuore che ricapitola gli stadi salienti dello sviluppo cardiaco umano, nonché i tipi di cellule presenti in sito e la loro struttura. In primo luogo gli organoidi sono stati prodotti in

modo innovativo ovvero non mediante l'assemblaggio di cellule diverse attorno ad un substrato, bensì mediante auto-assemblaggio in tre step. Nel primo si osserva la differenziazione delle cellule staminali; nel secondo, che è di fondamentale importanza, si riproducono le condizioni di sviluppo del mesoderma cardiaco e a seguire dell'epicardio sia in condizioni normoglicemiche sia in condizioni di iperglicemia. Gli organoidi hanno dimostrato un'elevata complessità data dalla presenza di cellule epicardiche, endocardiche, endoteliali e dei fibroblasti, e ancora nel presentare una struttura contenente camere interne e una rete vascolare propria. Per confermare la validità del modello si è inoltre provveduto a confrontare la trascrittoma degli organoidi, con quella derivante dai tessuti fetali umani in vivo. **Lo studio ha permesso di evidenziare che il tessuto cardiaco sottoposto a stress ipoglicemizzante, manifesta una serie di sintomi tra i quali la distensione del tessuto, la disorganizzazione dei tipi cellulari e aritmie nelle conduzione elettrica.** Il terzo ed ultimo step è rappresentato dal protocollo di fluorescenza, che ha lo scopo di eseguire successive metodiche di indagine sui tessuti cardiaci, per una migliore comprensione dei marker tissutali identificativi di alterazione in corso di iperglicemia.

Yonatan R. Lewis-Israeli, Mishref Abdelhamid, Isoken Olomu, Aitor Aguirre. Modeling the Effects of Maternal Diabetes on the Developing Human Heart Using Pluripotent Stem Cell-Derived Heart Organoids. Current Protocols. First published: 20 June 2022. <https://doi.org/10.1002/cpz1.461>

Epigenetica e cancro: nuove scoperte e approcci terapeutici



Nel complesso meccanismo di regolazione alla base dei processi di natura cancerogena, **un ruolo fondamentale lo gioca proprio la componente epigenetica.** G9a e EZH2 sono due istoni metiltransferasi ovvero due enzimi che regolano la metilazione dei residui di lisina e di arginina sugli istoni (proteina di supporto del cromosoma). In varie tipologie tumorali si è registrata una sovraespressione dei due enzimi, senza tuttavia aver chiarito il loro ruolo specifico. In questo studio si è dimostrato in primis la concomitante sovra espressione dei due enzimi in numerosi tumori

umani. Non solo si è visto che la cooperazione tra i due enzimi ha efficacemente silenziato l'avvio dei processi alla base dell'apoptosi cellulare tumorale. Partendo da linee cellulari di tumore al seno, tumore ovarico e melanoma è stato evidenziato come in tutti e tre i casi, l'inibizione simultanea dei due enzimi metiltransferasi si traduce in aumentata mortalità delle cellule tumorali, denotando un ruolo di controllo ed espressione chiave da parte dell'epigenetica. Quello che dunque si è potuto chiarire è il ruolo di queste due enzimi G9a e EZH2, i quali insieme sopprimono l'espressione di quei geni che determinerebbero lo stress del reticolo endoplasmatico e la conseguente liberazione di specie reattive dell'ossigeno ROS. In particolare la repressione della proteina IL24 interleuchina 24 (citochina fondamentale nell'induzione dell'apoptosi delle cellule tumorali) si traduce insieme al mancato stress del reticolo, nella proliferazione delle cellule tumorali. **La ricerca ha evidenziato che quando si va a depotenziare l'attività dei due enzimi, il risultato è la riattivazione dell'asse IL24/reticolo endoplasmatico, con conseguente apoptosi delle sole cellule tumorali, evitando così danni per il tessuto sano.** Nel caso del tumore ovarico, nel quale sono stati riscontrati valori di G9a maggiori di quelli rilevati in cellule analoghe sane, l'inibizione dell'enzima si è tradotta nel rallentamento della crescita cellulare e nella possibilità di eliminazione delle medesime. Ma la terapia sperimentale era rivolta non solo all'enzima G9a, ma altresì all'enzima EZH2, con conseguente aumento finale dell'IL24 fondamentale per l'apoptosi cellulare. Il risultato apre la strada alla messa a punto di farmaci che possono potenziare le risorse già a disposizione dell'organismo per combattere il processo tumorale, ma che tuttavia risultano inespresse a causa di enzimi che le rendono inattive. Queste terapie potrebbero essere utilizzate in molteplici patologie tumorali tra cui sicuramente il cancro al seno, alle ovaie e il melanoma.

Casciello F, et al. Combined Inhibition of G9a and EZH2 Suppresses Tumor Growth via Synergistic Induction of IL24-Mediated Apoptosis. *Cancer Res* (2022) 82 (7): 1208–1221, in *hra humane research australia* <https://www.humaneresearch.org.au/8125-2/> . <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-2218>

Lo sviluppo della tossicologia e della regolamentazione ad essa correlata, alla luce dei nuovi criteri di ricerca human-based



I NAMS utili alla valutazione del rischio per l'impiego delle sostanze chimiche sono pronti per entrare a far parte dell'uso regolatorio. Negli ultimi dieci anni sono stati spesi dall'Unione europea, dalle associazioni di categoria e dalle aziende che producono beni per la cura della persona, un miliardo di euro in sviluppo di test non animali proprio in risposta alle normative più stringenti in cosmesi adottate dall'Unione europea. Un elemento chiave in queste ricerche è stato da sempre la definizione del POD (punto di partenza dell'evento tossico) che per la ricerca condotta su animali, banalmente poteva essere rappresentato da una diminuzione del peso o da modifiche istologiche. Si è visto che i NAMS consentono di mantenere dei POD molto conservativi con valori inferiori a quelli ottenuti sugli animali. Proprio dall'incontro tra i POD più conservativi derivati dall'uso dei NAMS e le singole esposizioni chimiche specifiche, si derivano i nuovi concetti di rischio quali sono i NGRA (next generation risk assessments). **Si procede così con la sostituzione dell'endpoint apicale che vede la somministrazione di dosaggi elevati di sostanza chimica all'animale, con l'adozione di test in vitro che misurano la bioattività e di conseguenza fissano i relativi POD che saranno poi messi a confronto con i dati relativi all'esposizione e alla sua cinetica. Questo approccio consentirebbe di procedere con test che individuano in modo sicuro le criticità della sostanza, per altro nei suoi usi più comuni, evitando dosaggi spropositati, di scarso o nullo interesse.** Il sistema si completerebbe ad un secondo livello di specificità con gli AOP (modalità esiti avversi), che benchè importanti sono estremamente dettagliati e dunque da escludere in prima battuta. Brevemente si ricorda che ci sono 78 organi principali bersaglio, 5 principali e diversi meccanismi di tossicità e ancora 5 eventi chiave fondamentali per l'attivazione dei singoli processi. Come si può capire questo si traduce in circa 2000 test per un singolo dosaggio, e dunque diventa poco realizzabile da un punto di vista pratico-regolatorio, ecco perché si prescrive gli AOP in seconda battuta quando già si sono ottenute molte informazioni. **Gli approcci in vitro, saggi di bioattività, stanno diventando sempre più importanti e sono già utilizzati nelle procedure iniziale di screening di composti ad interesse agricolo, chimico, farmacologico, proprio per la loro capacità di differenziare i rischi specifici. Ancora i NAMS sono stati utilizzati per saggiare l'epatotossicità e la genotossicità di nuove molecole anti infiammatorie, per la rivalutazione della tossicità dello sviluppo dei PFAS, e ancora del fenossietanolo nei cosmetici.** Certamente molto lavoro deve essere fatto per mettere a punto sempre di più l'intero sistema di indagine, permangono infatti alcune criticità che però si è già cercato di affrontare relativamente ad alcuni composti difficili da testare in vitro, piuttosto che alle corrette individuazioni dei rapporti dose-risposta. Fortunatamente i NAM sono già in uso anche per decisioni di carattere normativo, come recentemente è accaduto per il Clorotalonil per il quale la valutazione è stata effettuata mediante l'uso di un sistema in vitro con cellule respiratorie umane, congiuntamente ad un modello computazionale per la deposizione delle particelle nel tratto respiratorio. Pertanto l'integrazione dei NAMS permette, evitando test su animali, di individuare i rischi connessi alla diversa esposizione al principio attivo, stabilendo a sua volta limiti e profili di sicurezza. La valutazione del rischio NGRA ha il suo focus nel pannello di test in vitro eseguiti a concentrazioni rilevanti per l'uomo che indicano la bioattività della sostanza, laddove la risposta sia pressoché nulla si ritiene che il rischio di possibili effetti avversi sia basso. Naturalmente possono essere effettuate, se lo si ritiene necessario, ulteriori valutazioni come quelle sui meccanismi AOP. Da sottolineare anche che i POD non sono necessariamente effetti avversi, rappresentano infatti delle perturbazioni dell'ambiente biochimico/biologico. I numerosi test in vitro già disponibili utili per la stima dell'assorbimento cutaneo, epatico, intestinale etc. consentono insieme ai livelli noti di esposizione umana ad una data sostanza di valutare i meccanismi della fisiokinetica e fisiodinamica interne (PBK), che associati a i valori POD di bioattività, si traducono nell'individuazione e determinazione finale del BER definito come determinazione del livello di sicurezza o anche il rapporto tra bioattività ed esposizione ad una data sostanza. Sulla base di questo rapporto bioattività/esposizione ne deriva che un BER grande, indica un sostanza che ai livelli di esposizione in uso in quel momento avrà scarsa possibilità di indurre effetti avversi, mentre viceversa un BER piccolo indica una sostanza potenzialmente pericolosa che è meglio evitare. Laddove il dato sia incerto si procede ad ulteriori test di verifica con sistemi micro fisiologici ad hoc. Infine il tutto può essere opportunamente

integrato da test in vitro volti a indagare la mielotossicità, la linfotossicità, la tossicità di sviluppo e di riproduzione, per molti di questi punti chiave esistono già test operativi. **L'obiettivo secondo gli autori, dovrebbe dunque essere quello di spostare l'ottica dall'arcaica ricerca condotta secondo i dettami della sperimentazione animale (test LD50 è stato introdotto nel lontano 1925), ad una moderna ricerca che correlata alle reali esposizioni umane e alle metodiche di indagine human-based, miri a determinare sempre meglio cosa sia tossico e in quali forme e dosaggi lo sia.**

Carmichael, P. L., Baltazar, M. T., Cable, S., Cochrane, S., Dent, M., Li, H., Middleton, A., Muller, I., Reynolds, G., Westmoreland, C. and White, A. (2022) "Ready for regulatory use: NAMs and NGRA for chemical safety assurance", *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 39(3), pp. 359–366. doi: 10.14573/altex.2204281.