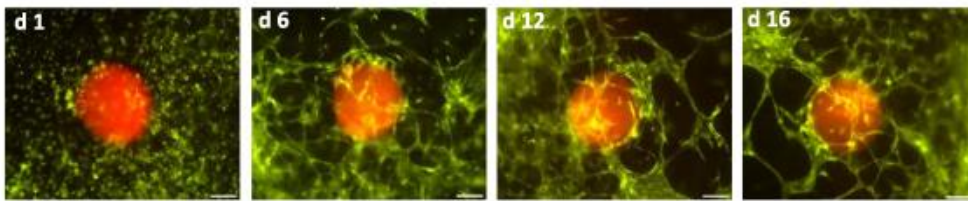


Cari Osanti,

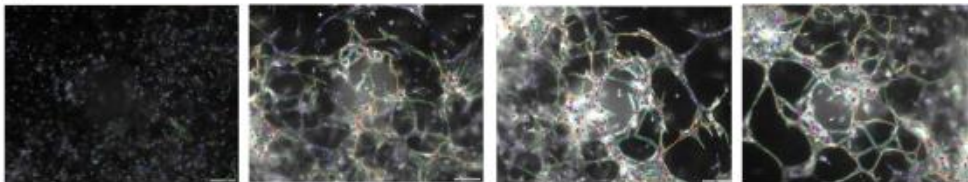
bentrovati. Questo numero è dedicato alle nuove frontiere nello studio del neuroblastoma, correlate all'utilizzo delle metodologie human based. Vedremo poi quanto l'impiego del nostro amico a quattro zampe, il cane, sia ancora molto diffuso nella ricerca che utilizza modelli animali, cercando di capire un pò meglio l'utilizzo che ne viene fatto e il grande lassismo in termini di registrazione dei dati inerenti tali sperimentazioni; da ultimo ci approcceremo ad uno studio che si è proposto di indagare le connessioni esistenti tra l'infezione da SARS-Cov-2 delle donne gestanti e le alterazioni del neurosviluppo fetale.

Modelli cellulari umani avanzati per studiare il Neuroblastoma, un tumore infantile dagli esiti spesso infausti

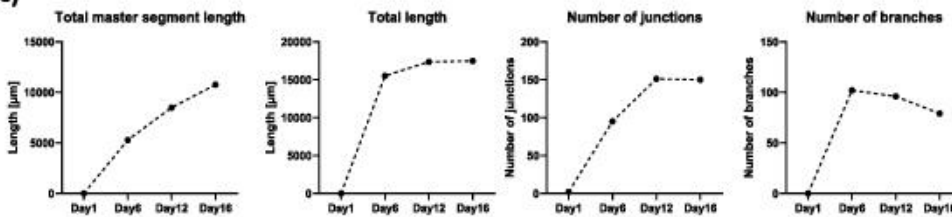
(a)



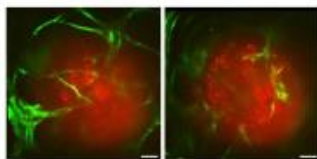
(b)



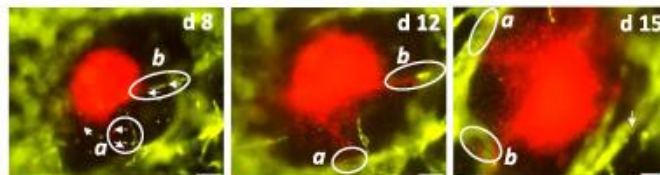
(c)



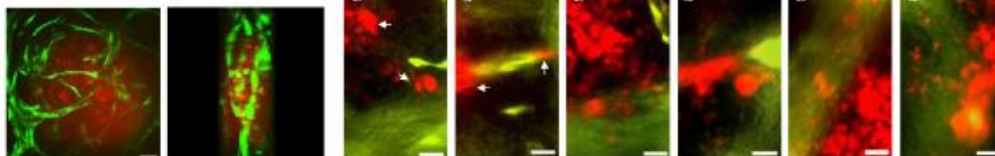
(d)



(f)



(e)



Il Neuroblastoma è un tumore solido extracranico che colpisce soprattutto nella prima infanzia con prognosi ancora troppo spesso infausta. E' un tumore maligno che trae origine da cellule primitive

del sistema nervoso autonomo. Sulla base dell'età del soggetto e della tipologia di alterazione genica in atto, i bambini affetti da neuroblastoma di stadio elevato, nonostante la chemioterapia e la radioterapia hanno una prognosi infausta che supera il 40%. Per migliorare la comprensione dei processi insiti nello sviluppo tumorale, occorre comprendere a fondo le dinamiche di interazione tra le cellule cancerose e quelle sane e le modalità con le quali il tumore realizza la sua espansione (vasi sanguigni, tessuto connettivo). Non solo, è altresì fondamentale comprendere il ruolo dell'espressione genica tenendo presente che questa non solo differisce tra i diversi tipi di tumore, ma anche tra un malato e l'altro. **Per questa ragione è più che mai importante lo sviluppo di sistemi tissutali microfluidici derivati da cellule tumorali, ma con la presenza di vasi sanguigni e cellule mesenchimali che sono necessarie per la stabilizzazione e propagazione della vascolarizzazione.**

L'obiettivo è testare i farmaci in modo da trovare quello più efficace per il singolo soggetto, con i minor effetti collaterali possibilmente. In prima battuta si è proceduto con il testare sostanze angiogeniche e antiangiogeniche, per valutarne la reale efficacia nella proliferazione vascolare. A questo proposito, volendo studiare l'angiogenesi spontanea, si è visto che a differenza dei fibroblasti che hanno funzione di sostegno per il vaso ma non ne inducono la proliferazione, le cellule MSC mesenchimali staminali derivanti da IPS staminali pluripotenti indotte, risultano in grado di differenziarsi in periciti e cellule muscolari lisce che sono fondamentali per lo sviluppo e il mantenimento del vaso al pari della ADSC staminali derivanti dagli adipociti. Si è dunque da prima stampato il supporto del modello, lo si è poi inciso per ricavarne la struttura speculare sulla quale la bio-stampante 3D potesse iniettare idrogel (polimeri dispersi in acqua a costituire un materiale biocompatibile) e componenti cellulari per la produzione della parte vascolare. Per quanto concerne il tessuto canceroso, si è provveduto a formare a partire da cellule tumorali ad alto grado, sferoidi poi collocati nello stampato tra i vasi sanguigni. La cosa sorprendente che si è potuto osservare è che a partire da 6 giorni dopo la messa in coltura globale, i vasi avevano avvolto gli sferoidi e in alcuni casi erano anche penetrati al loro interno. Sono state notate due diverse modalità di sviluppo degli organoidi:

-una nella quale gli organoidi sono stato avvolti esternamente dai vasi, cresciuti anche al loro interno, ma nonostante ciò la massa si è poco sviluppata; lo si è paragonato alla forma tumorale incapsulata meno aggressiva;

-una invece nella quale (giorno 8) si è assistito alla migrazione delle cellule tumorali (preventivamente colorate con un marker fluorescente) che hanno utilizzato i vasi per raggiungere il tessuto circostante, mimando un'attività metastatica precoce.

Al momento è ancora oggetto di studio cosa determini un fenotipo tumorale piuttosto di un altro, ma comunque in entrambi i modelli si è riscontrata l'attrazione dei vasi sanguigni, l'angiogenesi tumorale e la metastatizzazione. E' necessario comprendere se il diverso comportamento sottoteso all'espressione dei due fenotipi, sia da ricondursi a fattori meccanici connessi al posizionamento degli sferoidi in fase di allestimento, piuttosto che a fattori intrinseci tumorali o ancora all'ambiente specifico di sviluppo. **In quest'ultimo caso sarà importantissimo capire se le cellule ADSC staminali derivate da adipociti e in grado di trasformarsi in miociti, condrociti, periciti, osteoblasti, possano avere un ruolo nell'indirizzare la diversa progressione del tumore e se questo possa essere a sua volta correlato a caratteristiche individuali connesse anche all'età e al genere.**

Nothdurfter D, Ploner C, Coraça-Huber DC, et al. 3D bioprinted, vascularized neuroblastoma tumor environment in fluidic chip devices for precision medicine drug testing. *Biofabrication*. 2022;14(3). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac5fb7>.

Il cane, tra i modelli animali, continua ad essere molto utilizzato soprattutto negli USA

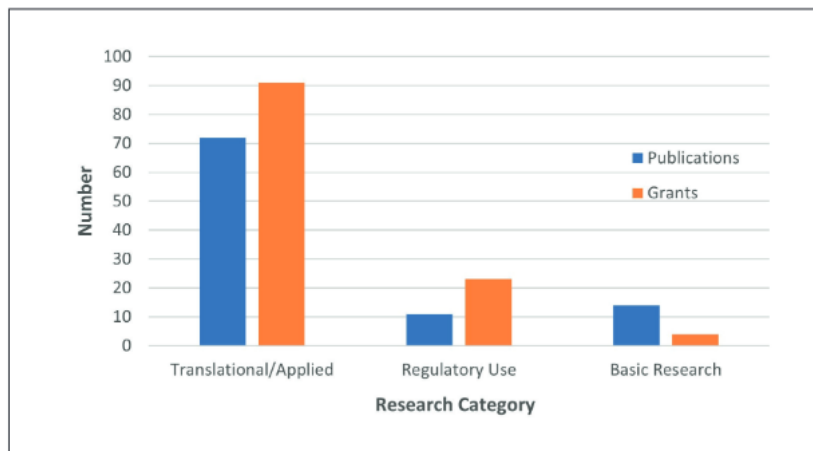


Fig. 1: Classification of the 97 publications and 118 grants in the study dataset according to "research category"
Numerical data are provided in Table S2¹⁷.

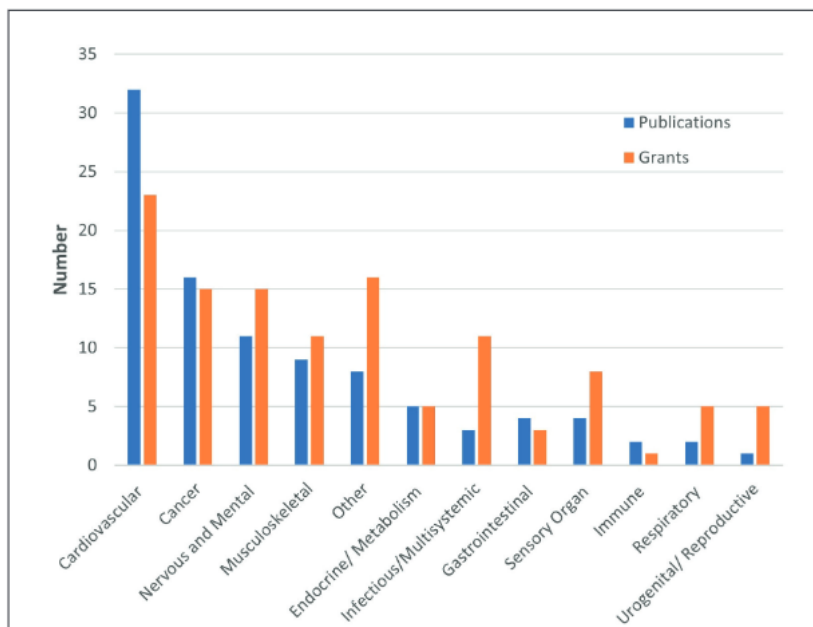


Fig. 2: Classification of the 97 publications and 118 grants in the study dataset according to "research subcategory"
Numerical data are provided in Table S2¹⁷.

Questo studio si è posto l'ambizioso obiettivo di vagliare l'utilizzo del cane quale modello animale fruito nella ricerca scientifica statunitense, cercando di quantificare il numero di soggetti complessivamente coinvolti e le diverse tipologie di esperimenti che ne hanno richiesto l'utilizzo. Gli autori sono concordi nel ritenere in generale i report sperimentali con le relative motivazioni e procedure, più spesso deficitari di informazioni. Pertanto si assiste a una parziale omissione di dati, maggiormente frequente negli USA, piuttosto che in Europa che complica notevolmente la ricostruzione della reale utilizzazione del cane quale specie animale. Da sottolineare che in Europa si è assistito ad una forte inversione di tendenza infatti, mentre negli ultimi dieci anni negli USA sono stati impiegati circa 60.000 cani all'anno, in Europa siamo passati dai 27.000 del 1991 ai 15.000 del triennio 2015-2018. Le fonti utilizzate sono state tre:

- database di Pubmed;
- National Institutes of Health (NIH);
- database USDA.

Dal materiale presente in pubmed sono stati selezionati 453 articoli utili alla ricerca e da questi ne è stato ricavato il 21% che sono 97 articoli che si contraddistinguono per un utilizzo invasivo. Il numero di cani utilizzato per le sole 97 ricerche selezionate erano pari a 2000 esemplari. Sono stati altresì selezionati 118 progetti borse di studio per i quali abbiamo dati meno certi ma quello che si ricava dalle proposte è l'utilizzo di complessivi 5.500 cani. Nel 2018 le 328 istituzioni americane hanno utilizzato più di 59,000 cani.

La specie più rappresentata è il Beagle, seguito da cani meticci. **Per quanto concerne l'ambito di impiego a predominare in assoluto è la ricerca traslazionale (compresa la tossicologia non regolatoria), a seguire ben distanziata troviamo la ricerca a fine regolatorio e quella di base.** Si è poi provveduto ad una sottocategorizzazione in ulteriori 12 tipologie di applicazione. Il primo ambito, ovvero quello più spesso ricorrente, è quello cardiologico, seguito dal settore oncologico e a seguire da molti altri. Da rilevare che nella sottocategoria "altro", piuttosto rilevante, sono ricomprese ricerche ematologiche, sulle corde vocali e di ortodonzia.

I ricercatori si sono poi occupati di verificare le ragioni addotte per l'impiego del cane. Queste le più frequenti:

- necessario negli studi preclinici;
- malattia o condizione che occorre naturalmente anche nel cane;
- malattia con caratteristiche fenotipiche simili nel cane e nell'uomo;
- necessita di un modello animale con taglia considerevole;
- similarità anatomiche e fisiologiche tra uomo e cane.

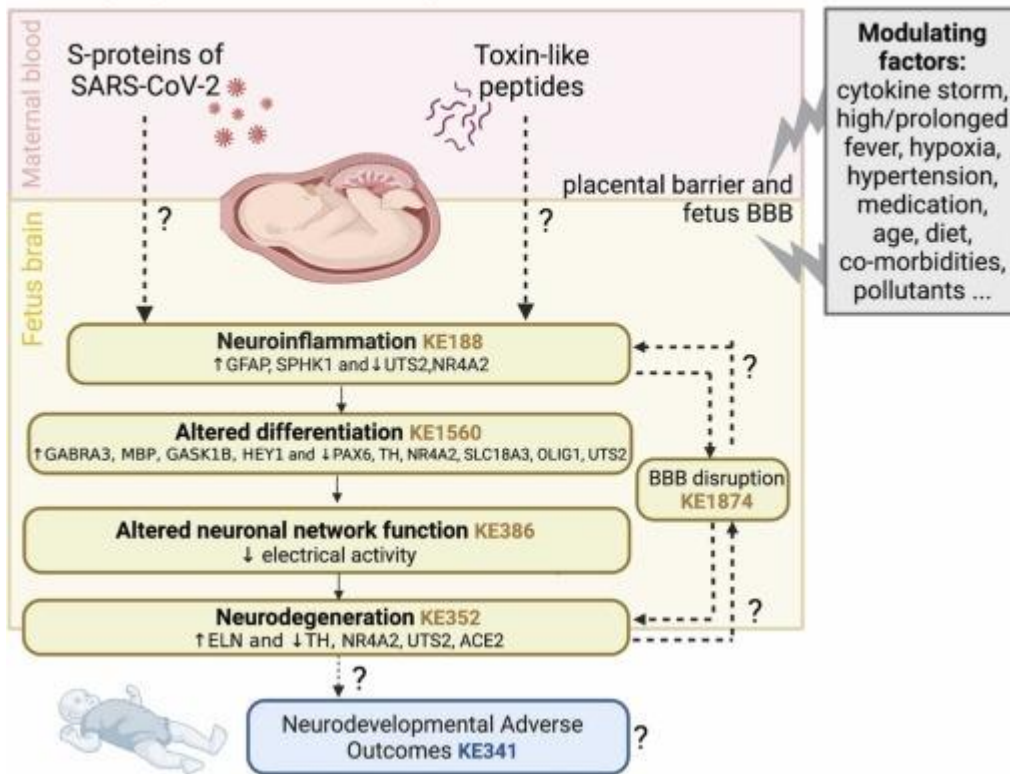
Per quanto concerne la reportistica sul dolore, non tanto nelle borse di studio dove è necessariamente tracciato, quanto nelle pubblicazioni si riscontra una percentuale elevatissima di report scarsamente compilati o addirittura totalmente assenti.

In questo modo non solo non si conosce il grado di dolore a cui è stato esposto il soggetto, ma non si conosce neppure quanto questo abbia influito sull'esito finale della ricerca. Sulla provenienza dei cani, per la maggior parte sono stati forniti da allevatori commerciali, a seguire da colonie riproduttive interne alle università o già presenti in aziende che fanno ricerca e al terzo posto da esemplari con proprietario. Veniamo dunque al destino finale dei cani impiegati, che per il 52% sono sottoposti ad eutanasia, in parte a riutilizzo se illesi dalla precedente sperimentazione, raramente si parla di affido e in molti casi non si menzionano informazioni in proposito. In alcuni casi poi si prevedono differenti endpoints, tali da consentire il ritorno a casa per i soggetti con proprietario e l'eutanasia per quelli che sono stati allevati per lo scopo. **Oh and Ishikawa, 2018 sostengono che i modelli animali di taglia grande (come il cane) sono anatomicamente e fisiologicamente simili al cuore umano, nello stesso anno però sostengono anche che gli stessi modelli non sono efficaci negli studi sull'obesità, sulle patologie metaboliche, sul ruolo dell'invecchiamento e persino di certi tipi di patologia cardiovascolare in cui le risposte uomo-cane non sono analoghe.** I modelli di aritmia nel cane si sono rivelati inefficaci, in quanto più spesso l'eziologia è multifattoriale e dunque si riscontra una componente genetica associata ad altre concause. Il NASEM nel 2020 nel suo rapporto sull'uso del cane tra i modelli di animale vertebrato, **ha evidenziato come non si possa giustificare l'uso asserendo che esistevano già dati di utilizzo precedente, in quanto rappresenta un circolo vizioso che non legittima realmente l'uso.** Si afferma anche che alcuni esperimenti non sono necessari e che certe tipologie di ricerca non dovrebbero prevedere l'impiego del cane, pertanto si continuerà a vigilare sulle giustificazioni addotte per l'impiego del cane nella sperimentazione.

Ward, S. L. and Osenkowski, P. (2022) "Dog as the experimental model: Laboratory uses of dogs in the United States", ALTEX - Alternatives to animal experimentation, 39(4), pp. 605–620. doi: 10.14573/altex.2109101.

SARS-CoV-2 e neurosviluppo fetale umano

Symptomatic COVID-19 positive mothers



L'esposizione del feto al SARS-CoV-2 si ritiene possa alterare il neurosviluppo del bambino. La proteina di interazione virus-cellula denominata ACE2 è stata trovata anche nel cervello del feto. Partendo da un precedente studio, nel quale si era riscontrata la presenza di un peptide analogo ad una tossina nel sangue, nelle urine e nel materiale fecale di pazienti con Covid-19 sintomatico, si è provveduto a mappare questo oligonucleotidi. Si è così scoperto che la loro sequenza di formazione era analoga a quella di sostanze ad azione neurotossica come le conotossine, le metalloproteinasi, gli attivatori della protrombina, le fosfolipasi A2 e i fattori della coagulazione, che si trovano comunemente in animali avvelenati, e che sono caratterizzate da elevata affinità e specificità per i recettori umani, per i canali ionici, per i trasportatori del sistema nervoso centrale, ad esempio per il recettore nicotinico dell'acetilcolina. Sull'origine del peptide sono state avanzate molte ipotesi, dal rappresentare una porzione virale, all'esito di una replicazione del virus in un batterio, alla risposta al virus da parte di un ceppo batterico, al momento senza avere una risposta definitiva in merito. Gli autori sottolineano come le tossine animali utilizzate ampiamente in campo medico, non sono mai state pienamente indagate sui loro possibili effetti deleteri nello sviluppo del cervello. I ricercatori hanno ipotizzato un possibile ruolo della tossina nella sintomatologia neurologica, pur rimanendo al contempo ancora ignoto l'eventuale passaggio placentare della medesima.

I modelli 3D come gli organoidi derivati dall'utilizzo delle cellule staminali pluripotenti indotte, sono in grado sia di mimare le caratteristiche salienti dello sviluppo cerebrale fetale umano, sia di indagare gli effetti sul neurosviluppo determinati dal SARS-CoV-2; ad esempio tramite gli organoidi è stato dimostrato che il virus del Covid-19 determina un indebolimento della sinaptogenesi eccitatoria. Da ricordare in proposito il progetto CIAO, il quale mira a modellare il Covid-19 mediante gli AOP, proprio al fine di identificare al meglio i processi meccanicistici alla base della patogenicità. Questo studio in particolare ha esaminato gli effetti a 72 ore derivanti dall'esposizione di neurosfere costituite da neuroni/glia ISPC derivati (coltivate 2 o 6 settimane), all'azione della proteina spike, dei peptidi simil tossina e della loro combinazione. Mediante l'utilizzo della PCR quantitativa è stato possibile dopo aver isolato gli RNA messaggeri, da prima retrotrascritti

in filamenti di DNA quindi amplificati e quantificati, evidenziare l'espressione genica di molecole chiave nei processi fisio-patologici quali ad esempio l'enzima di conversione dell'angiotensina 2. I risultati sull'espressione genica e della conducibilità elettrica intercellulare hanno portato a dati di neurotossicità in linea con quanto già riscontrato negli AOP del progetto CIAO, confermando la validità degli eventi meccanicistici individuati alla base dei processi patologici. Rimane aperta la questione sulla trasmissibilità verticale, in quanto ad oggi alcuni studi sostengono l'isolamento del Covid-19 nei feti di madri positive, mentre altri lo escludono quasi completamente in quanto feto e placenta di donne gravide e positive al Covid-19, sono risultati nei loro studi entrambi negativi. Gli autori sottolineano come il processo infiammatorio scatenato dal Covid, potrebbe essere causa di alterazioni nella permeabilità della placenta. **Gli autori ricordano infine che nel progetto CIAO si attua un approccio multifattoriale, tenendo in considerazione l'età, l'alimentazione, il microbiota intestinale, gli inquinanti ambientali** etc.

Pistollato F, et al. Effects of spike protein and toxin-like peptides found in COVID-19 patients on human 3D neuronal/glial model undergoing differentiation: Possible implications for SARS-CoV-2 impact on brain development. *Reprod Toxicol.* 2022 Aug;111:34-48. doi: 10.1016/j.reprotox.2022.04.011. Epub 2022 May 5.