

## **Valutazione neuropatologica della mielina in vitro: Modelli di malattia e risposta al farmaco**

Le neuropatie periferiche rappresentano una classe eterogenea di patologie del sistema nervoso che ormai da anni studiamo avvalendoci dell'utilizzo di modelli animali ed in vitro.

Questi modelli sperimentali richiamano molto da vicino la patologia umana e rappresentano quindi degli ottimi sistemi per studiare i meccanismi causativi e responsivi della malattia e per testare potenziali nuovi farmaci. Studi di efficacia terapeutica su modelli animali richiedono tempi lunghi e notevoli sforzi economici nonché l'uso di molti animali con i problemi etici connessi; il loro utilizzo è infatti sempre più limitato e ostacolato dalla nuova direttiva europea (DIRETTIVA 2010/63/EU).

I modelli *in vitro* sono invece meno costosi e più rapidi. In letteratura sono disponibili diversi sistemi di colture mielinizzanti centrali e periferiche; quello che noi abbiamo a disposizione per lo studio delle neuropatie periferiche, ereditarie ed acquisite, è rappresentato da colture primarie di gangli dorsali sensitivi (DRG) di embrione di roditore. Questi sistemi sono molto efficienti, infatti da una singola ratta gravida si ottengono una media di 40 colture mielinizzanti di gangli dorsali o co-colture di cellule di Schwann e neuroni. Ciascuna di queste colture può, in linea di principio, essere esposta separatamente ad un singolo composto o ad una diversa condizione sperimentale. E' quindi evidente che con tali tecniche si implementa enormemente il potenziale di analisi di singoli farmaci, evitando il sacrificio di molti animali da esperimento e rendendo il risultato rapidamente documentabile.

Molte molecole hanno un potenziale effetto stimolante la mielinizzazione o la rigenerazione assonale quando somministrate a queste colture ma, ad oggi, sistemi automatici di analisi di immagini che vadano oltre la semplice quantificazione della densità mielinica e che siano in grado di valutare parametri strutturali più complessi non sono disponibili.

Il fenotipo neuropatologico dis-demielinizzante associato alle diverse neuropatie periferiche che studiamo è spesso caratterizzato da una ridotta velocità di conduzione delle fibre mielinizzate. A sua volta, quest'ultima, dipende da parametri strutturali diversi che sono tra loro indipendenti, per cui per valutare l'eventuale effetto pro-mielinizzante di una molecola è necessario analizzarli tutti. In risposta a questa esigenza, nel nostro laboratorio, abbiamo messo a punto un sistema semi-automatico di analisi morfometrica in grado di valutare tali parametri in modelli di mielinizzazione in vitro in seguito a trattamenti farmacologici in condizioni normali e patologiche.

Le colture da analizzare sono fissate e marcate mediante tecnica di immunofluorescenza con anticorpi specifici per la mielina e l'assone (ad esempio MBP, Neurofilamenti, canali del Na e K, ecc.) per poi essere interamente fotografate e scansionate dal nostro sistema di analisi. I parametri che finora siamo riusciti a misurare comprendono la densità internodale, la percentuale di area mielinizzata, la lunghezza internodale, il diametro internodale e le relative frequenze. Questo tool ci permette di identificare in maniera rapida e accurata sostanze con effetto tossico sulla mielina, caratterizzare neuropatologicamente modelli in vitro di patologie mieliniche e soprattutto valutare gli effetti di molecole potenzialmente pro-mielinizzanti.

Avendo a disposizione il modello in vitro di una neuropatia ereditaria dismielinizzante chiamata Charcot-Marie-Tooth 1A (CMT1A) abbiamo analizzato, con il nostro sistema, un gran numero di colture CMT1A e le abbiamo caratterizzate misurando i parametri strutturali della mielina prima elencati: le colture malate hanno, non solo una evidente riduzione nel contenuto mielinico, dato già risaputo e quindi confermato, ma un'alterazione di parametri come la lunghezza internodale e il diametro internodale che finora non erano mai stati valutati in un sistema in vitro. Questa accurata caratterizzazione del fenotipo dismielinizzante CMT1A in coltura ci ha permesso di valutare l'effetto di molecole con potenziali caratteristiche pro-mielinizzanti sui diversi parametri

mielinici. Abbiamo testato numerose molecole che interferissero con i pathway che, in studi pregressi, abbiamo trovato alterati nella CMT1A; tra queste ne abbiamo individuate alcune che hanno migliorato il fenotipo patologico in vitro. Ad esempio il trattamento cronico con fosfatidilinositolo (3,4,5)-trifosfato (PIP3) e con acido lisofosfatidico, molecole che interferiscono con un pathway fondamentale del processo di mielinizzazione, hanno portato ad un aumento specifico nella densità mielinica; altre molecole come L-Serina e un inibitore di un enzima regolatore della sintesi mielinica (PTEN), hanno portato invece ad un miglioramento significativo dei parametri lunghezza e diametro internodale. Quindi molecole differenti agiscono in modo mirato su parametri mielinici specifici, contribuendo diversamente al miglioramento del fenotipo dismielinizzante CMT1A. Il trattamento cronico combinato di alcune di queste molecole ha portato allo sviluppo di un fenotipo patologico con caratteristiche neuropatologiche molto vicine alle colture mielinizzanti normali.

Naturalmente l'efficacia pro-mielinizzante di queste molecole deve essere testata successivamente nell'animale per poi eventualmente passare all'uomo; ma avvalendoci dei modelli in vitro e del nostro rapido sistema di analisi siamo in grado di fare uno screening accurato e veloce di un gran numero di potenziali farmaci e testarne quindi la reale efficacia e l'eventuale tossicità sulla mielina.

Quello che stiamo facendo ora è implementare il nostro tool in modo da aumentare il numero di parametri da valutare all'interno della coltura e fornire quindi un quadro più dettagliato del fenotipo patologico prima e dopo il trattamento farmacologico.